

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ESTUDIO FUNCIONAL DE LA SUBUNIDAD IKK α ,
MIEMBRO DEL COMPLEJO I κ B QUINASA, Y CYLD
EN LA FISIOPATOLOGÍA CUTÁNEA

TESIS DOCTORAL

RODOLFO MORENO MALDONADO
MADRID, 2007

El trabajo experimental presentado en esta memoria ha sido realizado en la División de Biomedicina Epitelial del Centro de Investigaciones Energéticas, Medioambientales y Tecnológicas (CIEMAT) de Madrid, bajo la dirección de los Doctores María de los Llanos Casanova Hernández y Ángel Ramírez Merino.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGÍA MOLECULAR

ESTUDIO FUNCIONAL DE LA SUBUNIDAD IKK α ,
MIEMBRO DEL COMPLEJO I κ B QUINASA, Y CYLD
EN LA FISIOPATOLOGÍA CUTÁNEA

VºBº directores de tesis

Dra. María de los Llanos Casanova Hernández

Dr. Ángel Ramírez Merino

TESIS DOCTORAL

RODOLFO MORENO MALDONADO

MADRID, 2007

A mis padres
y hermanos.
A Irene.

AGRADECIMIENTOS

Hace ya más de cuatro años que comencé una nueva etapa profesional en el CIEMAT con el objetivo de realizar la tesis doctoral. Durante este tiempo he tenido la suerte de aprender muchísimas cosas relacionadas con la Biología Molecular, pero también he tenido la oportunidad de conocer a un grupo de personas que ha influido muy positivamente en mi vida profesional y personal y a todas ellas les quiero agradecer la ayuda que me han ofrecido, ya que, de alguna manera u otra, todos han hecho posible que este trabajo de investigación haya salido adelante y ahora mismo pueda estar escribiendo estas palabras, lleno de orgullo y satisfacción.

En primer lugar, quiero agradecer al Dr. José Luís Jorcano, al cual admiro, el brindarme la oportunidad de formar parte de este grupo de investigación de excelencia y seguir confiando en mi trabajo y dedicación después de estos cuatro años en su laboratorio. Muchísimas gracias José Luís.

A mis directores de tesis, Llanos y Ángel a los que quiero agradecer enormemente todo lo que me han enseñado durante estos años. Por haberos volcado en mí y por todo el apoyo que me habéis dado siempre (tanto en lo profesional como en lo personal). Gracias de verdad por confiar en mí y en haber hecho posible que este trabajo, con mucho esfuerzo por parte de todos, haya salido adelante. Vosotros sois los auténticos artífices de este trabajo. Gracias.

Al resto de componentes de mi grupo, Angus, Manuel e Isabel de los Santos. Gracias Angus por haber sido tan buena compañera conmigo y haberme enseñado muchas cosas (también por tus protocolos, reactivos y haberme sacado de muchos apuros en tantas ocasiones, claro). Ya sabes que tú eres la siguiente en presentar la tesis ¡¡Mucho ánimo!! A Manuel, aunque tus chistes son a veces un poco malos, te agradezco todo lo que me has enseñado, y tu ayuda, en lo referente a la extracción de ARN, PCR cuantitativa, microarrays, etc. Qué puedo decir de ti, Isabel, muchas gracias por tu dedicación y ayuda (cortes histológicos, inmunohistoquímicas, hibridaciones, etc.). Gracias por ser como una madre para mí, y que no todos tienen la suerte de poder contar, y por la alegría que nos contagias a todos.

A M^a Jesús Fernández-Aceñero, Concepción Villanueva (Hospital de Móstoles) y especialmente a Ana Bravo (Universidad de Lugo), por vuestra inestimable ayuda en el análisis patológico de innumerables muestras histológicas de pieles de ratón, tumores, etc. Muchas gracias también por vuestros comentarios ya que me han permitido conocer y entender un poco mejor muchos conceptos importantes que se desarrollan en este trabajo.

A todos los “Senior” del laboratorio: Marcela, Carmen, Mirentxu, Corina, Fernando, Jesús Paramio, Ramón y Rodolfo Murillas. Gracias por vuestra buena disposición siempre que he acudido a vosotros y haber sido un muy buen ejemplo profesional para mí. Gracias Rodolfo por todas tus enseñanzas en el mundo del ARN interferente. Gracias Ramón por tus comentarios muy útiles sobre ARN y PCR cuantitativa.

A todo el personal del animalario, en especial a Jesús Martínez, por su encomiable labor como responsable del animalario del CIEMAT y que me ha ayudado en numerosas ocasiones en el trabajo con animales. Muchas gracias a Pilar por su apoyo técnico en el laboratorio y sus cortes histológicos.

A todo el resto de compañeros del laboratorio, que formamos un gran grupo y con los que tengo una gran amistad. Gracias por hacer que el día a día y lo cotidiano del laboratorio sea más llevadero. Gracias por toda vuestra ayuda (¡¡que no ha sido poca!!), por tener siempre una sonrisa cuando nos cruzamos por los pasillos, por escucharme, por los buenos momentos en nuestras salidas nocturnas. Muchas gracias de verdad a todos. Siempre tendré una anécdota que recordar con cada uno de vosotros que harán revivir con alegría algún momento de estos cuatro años juntos. Gracias a mis compañeros de despachito (los que han pasado por él y los que siguen estando): Marta Moral, Ana, Laura, Cloti, Cristina, Águeda, MariFer, Vanesa, Toñi, Sergito. Gracias a mis chicas del despacho de abajo: Marta G, Marta C, Isa, Mariajo, Lucía, Blanca, Almudena, Sara, Luisa, Sole (aunque estás arriba) y Edi (aunque estás abajo). Gracias también a los chicos del labo (que somos pocos pero que “sobrevivimos” a pesar de todo) a Kiko y David. ¡¡Tengo muchas ganas de poder salir pronto a celebrarlo!!

A todo el grupo de Hematopoyesis, en especial a Juan, Maruja (algún día te traeré las recetas), Israel, Guillermo, José Carlos, Jaco, Beatriz, Rosa, Paula, Óscar, M^a Eugenia, África, Susana N, Elena, M^a Luz, Ariana, Néstor, Miguel y Sergio.

A Elena y Aurora, por facilitarnos mucho el trabajo a la hora de gestionar los pedidos y otros cientos de cosas (además de tener siempre esa reserva que nos salva en más de una ocasión). También a Rubén por su gran eficacia y disposición a la hora de realizar cualquier trámite.

Al Dr. Dennis Roop, del Departamento de Biología Molecular, Celular y Dermatología (Baylor Collage of Medicine, Houston, Texas) por ofrecirme la posibilidad de realizar una estancia de tres meses en su laboratorio y disfrutar de una experiencia fantástica ¡¡con Huracán incluido!!. Gracias también a Maranke Koster, Carlos Caulin, William y Sergio por todo.

A todos mis amigos que, aunque últimamente me ven poco el pelo, me apoyan y saben el sacrificio que conlleva muchas veces este trabajo. Gracias especialmente a Miguel Ángel, Javi, Rubén, Pablo y Arancha (¡¡dentro de poco te toca a tí!!). Gracias a Ana y a Oscar (¡¡felicidades pareja!!).

Por último quiero agradecer a toda mi familia (abuela, primos y tíos) que han estado siempre viviendo la tesis desde un punto de vista más personal (animándome y escuchándome) y por su esfuerzo en entender lo que hace el “científico” de la familia. A Ernesto y a Emilia por su gran apoyo y haberme aceptado en su familia como si fuera un hijo más. A mis hermanos M^a José, Marta y Javier y a mis cuñados Pablo e Irene, por ser estupendos y por tener la suerte de poder contar con ellos siempre, en cualquier circunstancia de la vida. A mi sobrino Pablo por ser tan cariñoso, listo y animarme con la alegría que desprende. A mis padres, porque me han enseñado los valores más importantes de la vida como son el amor, la familia, el respeto y la honestidad. Ellos han sido mi modelo a seguir y les agradezco todo cuanto han hecho por mí. Quiero señalar muy especialmente mi admiración hacia mi Padre, por darme la que posiblemente sea la lección más importante de todas: el amor a la vida.

A Irene, una persona extraordinaria y lo más importante en mi vida. Gracias por estar siempre a mi lado y confiar en mí.

SUMMARY

The epidermis is a squamous stratified epithelia comprising a basal layer of proliferative cells and several differentiating suprabasal layers. Alterations in the control of cell proliferation and differentiation lead to diverse pathologies, being skin cancer the most frequent tumor in developed countries. Better knowledge of the molecular mechanisms of keratinocyte differentiation will be useful for the treatment of poorly differentiated SCCs, generally of poor prognosis. Among the relevant molecules for epidermal morphogenesis, IKK α has been shown to play an essential role. In addition, mutations of *Ikk α* in human SCCs have been recently described, suggesting a role of IKK α in skin diseases. To investigate the mechanisms underlying the role of IKK α in terminal differentiation of keratinocytes and development of skin tumors, we have examined the biological effects of the increased expression of IKK α in mouse and human keratinocytes. We have found that enhanced IKK α expression increase both early and terminal differentiation of keratinocytes through an E-cadherin-dependent mechanism. Exogenous expression of IKK α in mouse tumorigenic epidermal cells leads, when inoculated into nude mice, to changes in the differentiation pattern and the histological variant of the resulting SCCs, resembling acantholytic SCCs (ASCCs), with elevated expression of both IKK α and E-cadherin proteins and absence of keratins K1 and K10 that usually are coexpressed with those proteins. Although human ASCCs are tumors considered to have aggressive clinical course and high risk of metastasis, nothing is known about their etiology. We have found that human ASCCs show the same properties that mouse ASCCs: they express high levels of both IKK α and E-cadherin with absence of keratins K1 and K10. Moreover, we have observed an increase in the invasion potential of HaCaT cells overexpressing IKK α in a dermo-epidermal equivalent, associated to an increase in MMP-9 and Snail expression. This result correlates with the prognosis aggravation of skin tumors observed when different protocols of skin carcinogenesis were performed in a transgenic mouse model overexpressing IKK α under the control of keratin K5 promoter.

The tumor suppressor gene *CYLD* (a negative regulator of NF- κ B pathway) has been related to epithelial tumor formation. Specifically, *CYLD* mutations cause the rare epidermal disease named familial cylindromatosis (or turban tumors syndrome), which is associated to the development of multiple benign neoplasm of skin appendages. Although a role for *CYLD* in skin morphogenesis has not been established, its function in the development of benign tumors of the skin in human and mice has been described. However, these studies have been focused on the role of *CYLD* mutation in normal cells. To study the role of *CYLD* in the tumorigenic properties of skin SCCs produced by transformed epidermal cells, we have expressed a mutated form of *CYLD* that acts as a dominant negative of *CYLD* activity. We show that the expression of this *CYLD* mutant in tumorigenic epidermal cells aggravates the malignant behaviour of cells and the prognosis of tumors obtained in mouse skin carcinogenesis experiments.

ABREVIATURAS

%	Tanto por ciento.
° C	Grado Celsius.
6-FAM	6-Carboxifluoresceína. Isómero derivado de la fluoresceína.
µg, µl, µM	Microgramo, microlitro, micromolar.
ADN	Ácido desoxirribonucleico.
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario.
ADP	Adenosín difosfato.
AJs	Del inglés, <i>adherent junctions</i> . Uniones adherentes.
ARN	Ácido ribonucleico.
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero.
ARNt	Ácido ribonucleico transferente.
ASCC	Del inglés, <i>acantholytic squamous cell carcinoma</i> . Carcinoma escamoso acantolítico.
ATP	Adenosín trifosfato.
B6D2F1	Animales híbridos de la primera generación (F1) procedentes de cruces entre hembras C57BL/6J y machos DBA/2J.
BCC	Del inglés, <i>basal cell carcinoma</i> . Carcinoma de células basales.
BMP	Del inglés, <i>bone morphogenetic protein</i> . Proteína morfogenética ósea.
BP	Del inglés, <i>biological process</i> . Procesos biológicos.
BrdU	Bromo-deoxiuridina.
BSA	Del inglés, <i>bovine serum albumine</i> . Seroalbúmina bovina.
CAC	Cáncer asociado a colitis.
CC	Del inglés, <i>coiled-coil</i> . Dominios de espiral enrollada.
CC	Del inglés, <i>cellular component</i> . Componente celular.
CHX	Cicloheximida.
CMV	Citomegalovirus.
CYLD	Cilindromatosis.
DAB	Diaminobencidina.
DAPI	Del inglés, <i>4, 6 diamidin-2-phenyl-indole</i> . 4,6 diamidino-2-fenil-indol.
dATP	Deoxiadenina trifosfato.
DAVID	Del inglés, <i>Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery</i> . Base de datos para el análisis de <i>microarrays</i> .
dCTP	Deoxicitidina trifosfato.
DMBA	7, 12-dimetil-benzoantraceno.
DMEM	Del inglés, <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> . Medio de cultivo Eagle modificado por Dulbecco.
DMSO	Dimetil sulfóxido.
dNTP	Deoxinucleotidil trifosfato.
dpn	Días post-nacimiento.
dsRNA	Del inglés, <i>double-stranded RNA</i> . ARN de doble cadena.

Abreviaturas

DTT	Ditiotreitol.
dUTP	Deoxiuridina trifosfato.
EDTA	Etilén-diamino-tetra-acetato.
EGF	Del inglés, <i>epidermal growth factor</i> . Factor de crecimiento epidérmico.
EGTA	Etilén-glicol-tetra-acetato.
ELISA	Del inglés, <i>enzyme linked immunosorbant assay</i> . Ensayo de inmunoabsorbancia ligada a enzimas.
ES	Del inglés, <i>embryonic stem (cells)</i> . Células madre embrionarias.
FBS	Del inglés, <i>fetal bovine serum</i> . Suero fetal bovino.
FELASA	Del inglés, <i>Federation of European Laboratory Animal Science Association</i> .
G418	Geneticina.
h	Horas.
HEK	Del inglés, <i>human embryonic kidney</i> . Células humanas embrionarias de riñón.
HBS	Del inglés, <i>Hepes buffered saline</i> . Tampón Hepes salino.
HDAC	Del inglés, <i>histone deacetylase</i> . Deacetilasa de histonas.
HEPES	Ácido N2-hidroxietilpiperacina-N'-2-etanosulfónico.
H/E	Hematoxilina/eosina.
HLH	Del inglés, <i>helix-loop-helix</i> . Dominio tipo hélice-bucle-hélice.
IgG	Inmunoglobulina.
IKK	Del inglés <i>IκB kinase</i> . Quinasa de IκB.
IL	Interleuquina.
IP	<i>Incontinentia Pigmenti</i> .
K	Del inglés, <i>keratin</i> , Queratina.
KD	Del inglés, <i>kinase domain</i> . Dominio con actividad quinasa.
KDa	Kilodalton.
KDIF	Del inglés, <i>keratinocyte differentiation-inducing factor</i> . Factor inductor de diferenciación en queratinocitos.
Kpb	Kilopares de bases.
LOH	Del inglés, <i>lost of heterozygosity</i> . Pérdida de heterocigosidad.
LZ	Del inglés, <i>leucine-zipper</i> . Motivo tipo cremallera de leucina.
MAPK	Del inglés, <i>mitogen-activated protein kinase</i> . Proteína quinasa activada por mitógenos.
MEFs	Del inglés, <i>mouse embryonic fibroblasts</i> . Fibroblastos embrionarios de ratón.
MEKK	Del inglés <i>MAP/ERK kinase kinase</i> . Proteína quinasa de la quinasa de MAP y ERK.
MGB	Del inglés, <i>minor groove binder</i> . Sonda con capacidad de unión al surco menor del ADN.
min	Minutos.
mg, ml, mM	Miligramo, mililitro, milimolar.

Mut	Mutación en el gen descrito.
NEMO	Del inglés <i>NF-κB essential modulator</i> . Modulador esencial de NF- κ B.
NES	Del inglés, <i>nuclear export signal</i> . Secuencia de exportación nuclear.
NF- κ B	Del inglés, <i>nuclear factor κB</i> . Factor nuclear κ B.
ng	Nanogramo.
NIK	Del inglés, <i>NF-κB inducing kinase</i> . Quinasa inductora de NF- κ B.
NLS	Del inglés, <i>nuclear localization sequence</i> . Secuencia de localización nuclear.
PAGE	Del inglés, <i>polyacrilamide gel electrophoresis</i> . Electroforesis en gel de poliacrilamida.
pb	Pares de bases.
PBS	Del inglés, <i>phosphate buffered saline</i> . Tampón fosfato salino.
PCR	Del inglés, <i>polymerase chain reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa.
PET	Polietileno Teraftalato.
pg	Picogramo.
PKR	Del inglés, <i>protein kinase R</i> . Proteína quinasa R.
PMSF	Del inglés, <i>phenylmethilsulfonylfluoride</i> . Fenil-metil-sulfonyl-fluoruro.
PNK	Del inglés, <i>polynucleotide kinase</i> . Polinucleótido quinasa.
p/v	Peso/volumen.
Ref	Referencia.
RISC	Del inglés, <i>RNA-inducing silencing complex</i> . Complejo inductor de silenciamiento de ARN.
RNAi	Del inglés <i>interfering RNA</i> . ARN interferente.
RNasa P	Endorribonucleasa P.
rpm	Revoluciones por minuto.
RT	Del inglés, <i>room temperature</i> . Temperatura ambiente.
RT-PCR	Del inglés, <i>reverse transcription polymerase chain reaction</i> . Reacción en cadena de la polimerasa reversa.
RT-qPCR	Del inglés, <i>real time quantitative PCR</i> . PCR cuantitativa en tiempo real.
SCC	Del inglés, <i>squamous cell carcinoma</i> . Carcinoma escamoso.
SDS	Del inglés, <i>sodium dodecyl-sulphate</i> . Dodecil sulfato sódico.
siRNA	Del inglés, <i>small interfering RNA</i> . ARN interferente de pequeño tamaño.
SSC	Del inglés, <i>sodium chloride/sodium citrate</i> . Tampón de citrato sódico y cloruro sódico.
TBE	Tris-borato-EDTA.
TBS	Del inglés, <i>Tris buffered saline</i> . Tampón Tris salino.
TCR	Del inglés, <i>T cell receptor</i> . Receptor de células T.
TdT	Del inglés, <i>terminal deoxynucleotidil transferase</i> . Transferasa terminal de nucleótidos.
TE	Tris-EDTA.
TEM	Transición epitelio-mesénquima.

Abreviaturas

TGF- β	Del inglés, <i>transforming growth factor-β</i> . Factor de crecimiento transformante- β .
TLR	Del inglés, <i>toll-like receptor</i> . Receptor tipo Toll-like.
TNF- α	Del inglés, <i>tumoral necrosis factor-α</i> . Factor de necrosis tumoral- α .
TNFR	Del inglés <i>TNF-α receptor</i> . Receptor de TNF- α .
TPA	Tetradecanoil-forbol-acetato.
Tris	Tris-(hidroximetil)-aminometano.
TSP	Trombospondina.
TUNEL	Del inglés, <i>TdT-mediated dUTP nick end labeling</i> . Marcaje de extremos con dUTP mediado por la enzima TdT.
UI	Unidades internacionales.
VEGF	Del inglés, <i>vascular endothelial growth factor</i> . Factor de crecimiento del endotelio vascular.
v-Ha- <i>ras</i>	Del inglés, <i>Harvey rat sarcoma viral oncogene</i> . Oncogén viral Harvey- <i>ras</i> .
v/v	Volumen/volumen.
Wt	Del inglés, <i>wild type</i> . Forma nativa o silvestre.
ZF	Del inglés <i>zinc finger</i> . Dominio tipo dedo de zinc.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN.....	1
1.1	El complejo IκB quinasa (IKK).....	3
1.1.1	Estructura del complejo IKK.....	4
1.1.2	Funciones principales de las subunidades del complejo IKK	5
1.1.2.1	Funciones de IKKα	6
1.1.2.2	Funciones de IKKβ.....	8
1.1.2.3	Funciones de IKKγ.....	8
1.1.3	Mecanismos de regulación del complejo IKK y de NF-κB. El gen CYLD	9
1.2	La piel	13
1.2.1	Características generales de la piel.....	13
1.2.2	Diferenciación epidérmica	14
1.2.3	El folículo piloso	16
1.3	Tumorigénesis de piel.....	18
1.3.1	Aproximaciones para el estudio de la carcinogénesis de piel	19
1.3.1.1	Carcinogénesis química en piel de ratón	19
1.3.1.2	Inyección subcutánea de células en ratones inmunodeficientes	21
1.3.2	El complejo IKK en la carcinogénesis epitelial.....	21
1.3.3	CYLD en la carcinogénesis epidérmica	22
1.3.4	El factor de transcripción NF-κB en la carcinogénesis epidérmica	23
1.4	Silenciamiento génico por interferencia de ARN.....	23
2	OBJETIVOS	27
3	MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
3.1	Plásmidos utilizados y subclonajes.....	33
3.2	Cultivos celulares	35

3.2.1	Medios de cultivo	35
3.2.2	Condiciones de cultivo	35
3.2.3	Líneas celulares	36
3.3	Transfecciones celulares	36
3.3.1	Transfecciones estables	36
3.3.2	Transfecciones transitorias	37
3.4	Diferenciación de las células HaCaT	37
3.4.1	Obtención de corneocitos	38
3.4.2	Preparación de geles de fibrina para los cultivos de equivalentes de piel	38
3.5	Actividad metaloproteinasa.....	39
3.6	Ensayo de bloqueo de cadherina-E.....	39
3.7	Ensayos de proliferación y clonogenicidad	40
3.8	Ensayo de crecimiento en suspensión	40
3.9	Detección de VEGF en el medio de cultivo de queratinocitos.....	40
3.10	Cinética de degradación de $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$.....	41
3.11	Ensayo de unión al ADN de NF-κB	41
3.12	Ensayos de apoptosis.....	41
3.13	Animales de experimentación	42
3.13.1	Cepas de ratón empleadas.....	42
3.14	Generación de animales transgénicos.....	42
3.14.1	Construcción K5-IKK α	42
3.14.2	Construcción SUPER-1	43
3.14.3	Microinyección pronuclear.....	43
3.15	Análisis genotípico de ratones transgénicos.....	44

3.16	Aislamiento de ARN y análisis por <i>Northern blot</i>	46
3.17	Análisis de expresión por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR) ..	47
3.18	Análisis de cortes histológicos y cultivos celulares por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia	48
3.19	Obtención de extractos proteicos y análisis por <i>Western blot</i>	49
3.19.1	Obtención de extractos proteicos totales	49
3.19.2	Fraccionamiento celular	49
3.19.3	Inmunodetección de proteínas	50
3.20	Ensayo de depilación del lomo de ratón	51
3.21	Ensayos de carcinogénesis mediante inyección subcutánea de células en ratones inmunodeficientes.....	51
3.22	Carcinogénesis química en piel de ratón	51
3.23	Ensayos de permeabilidad vascular	52
3.24	<i>Microarrays</i>	52
3.25	Análisis estadístico	53
4	RESULTADOS	55
4.1	Estudio funcional de IKKα en líneas de queratinocitos.....	57
4.1.1	IKK α acelera la diferenciación de los queratinocitos humanos	57
4.1.2	La vía de señalización NF- κ B no parece ser responsable de los cambios en diferenciación de las células H-IKK α	60
4.1.3	IKK α regula la diferenciación de los queratinocitos por un mecanismo dependiente de cadherina-E	61
4.1.4	IKK α incrementa las propiedades proliferativas y clonogénicas de las células HaCaT	63
4.1.5	Diferenciación alterada de H-IKK α e incremento de la capacidad invasiva en un modelo de equivalentes de piel.....	64
4.1.6	Análisis del patrón de expresión génico en equivalentes de piel	68

4.1.7	IKK α aumenta la expresión de cadherina-E en tumores e induce un cambio en la variante histológica de los SCCs	70
4.1.8	Los tumores C57-IKK α murinos se asemejan a los ASCCs humanos.....	76
4.2	Estudio mediante ratones transgénicos del papel de IKKα en la morfogénesis y tumorigénesis cutánea	78
4.2.1	Ratones transgénicos K5-IKK α	78
4.2.1.1	Generación de líneas de ratones K5-IKK α	78
4.2.1.2	Análisis de la expresión de la proteína IKK α en ratones K5-IKK α	79
4.2.1.3	Análisis del nivel de ARN mensajero en K5-IKK α	80
4.2.1.4	Expresión de miembros de la vía de NF- κ B	81
4.2.1.5	Tumorigénesis de piel en los ratones K5-IKK α	82
4.2.2	Inhibición de la expresión de IKK α por interferencia de ARN en ratón: ratones <i>knockdown</i> para IKK α	85
4.2.2.1	Análisis del funcionamiento de siRNAs contra IKK α de ratón.....	85
4.2.2.2	Generación de ratones transgénicos SUPER-1	87
4.2.2.3	Análisis de la expresión de siRNAs en los transgénicos SUPER-1	88
4.2.2.4	Inhibición de la expresión de IKK α en los ratones transgénicos SUPER-1 ...	91
4.2.2.5	Los animales SUPER-1A presentan alteraciones en pelo.....	92
4.3	CYLD y la tumorigénesis epidérmica.....	95
4.3.1	La inhibición de la actividad de CYLD incrementa la agresividad tumoral de los SCCs	95
4.3.2	Aumento de los rasgos de malignidad en líneas epidérmicas tumorigénicas por expresión del dominante negativo de CYLD.....	98
5	DISCUSIÓN	103
5.1	IKKα en la diferenciación de los queratinocitos	105
5.2	IKKα en la proliferación de los queratinocitos y la progresión de tumores de piel	112
5.3	Interferencia de ARN en animales transgénicos	116

5.4	Función de CYLD sobre las propiedades tumorigénicas de células epidérmicas y de SCCs	118
6	CONCLUSIONES	121
7	BIBLIOGRAFÍA	125
8	ANEXO I	147

1 INTRODUCCIÓN

La piel es el mayor órgano del ser humano, formando la barrera entre el organismo y su ambiente. Se compone de diversos tejidos que han evolucionado para cumplir las funciones esenciales de este órgano. Entre ellas se encuentran la protección frente a la pérdida de agua, así como funciones inmunológicas, protegiendo de la entrada de patógenos, sensitivas, a través de receptores cutáneos de presión, dolor y temperatura, y metabólicas, almacenando energía en forma de triglicéridos y sintetizando vitamina D. Por tanto, la correcta morfogénesis y funcionamiento de la piel son esenciales para proteger al individuo de factores nocivos externos y mantener sus sistemas internos intactos. Son numerosas las alteraciones patológicas descritas de la piel, entre las que podemos destacar las enfermedades inflamatorias y el cáncer de piel; de hecho, el cáncer cutáneo no melanoma representa la mayoría de las neoplasias diagnosticadas. Estas afecciones, si bien con frecuencia no son letales, sí producen discapacidades de tipo físico y emocional. Por ello, es importante la caracterización de genes relevantes en la aparición de estas enfermedades. La vía de señalización del factor de transcripción NF- κ B y sus elementos reguladores, se revelan como moléculas importantes para la fisiopatología cutánea. En concreto, la subunidad IKK α del complejo IKK (I κ B quinasa) parece ser esencial para la morfogénesis de la piel, aunque hasta ahora no se conoce a través de qué mecanismo; existe controversia en cuanto al papel que desempeña IKK α en el desarrollo tumoral y se desconoce por completo si puede estar implicada en la aparición de otras patologías cutáneas distintas al cáncer. De ahí la relevancia del estudio que se presenta en esta memoria.

1.1 El complejo I κ B quinasa (IKK)

El complejo IKK es un multímero formado, al menos, por dos subunidades catalíticas, IKK α e IKK β (DiDonato y cols., 1997; Mercurio y cols., 1997), y una subunidad reguladora indispensable para la activación del complejo, IKK γ o NEMO (*NF- κ B essential modulator*) (Rothwarf y cols., 1998; Yamaoka y cols., 1998). El complejo IKK es un elemento central en la regulación de la actividad del factor de transcripción NF- κ B (factor nuclear κ B), ya que es responsable de la fosforilación del inhibidor de NF- κ B, I κ B, permitiendo así la activación y entrada de NF- κ B libre al núcleo, donde activará sus genes diana correspondientes (Ghosh y Karin, 2002). NF- κ B es un factor de transcripción heterodimérico y ubicuo que juega un papel central en procesos de inflamación y crecimiento celular, siendo fundamental en la regulación de procesos tan importantes como son apoptosis, desarrollo y respuesta inmune, entre otros (Li y Verma, 2002; Kucharczak y cols., 2003; Karin, 2006a). Se asocia además una elevada actividad de NF- κ B con numerosas enfermedades, como cáncer, artritis, asma, enfermedades cardíacas y enfermedades neurodegenerativas (Ghosh y Karin, 2002; Perkins, 2007).

La familia Rel/NF- κ B está formada por un conjunto de proteínas conservadas en la evolución y estructuralmente relacionadas, que en mamíferos se encuentra constituida por cinco miembros: RelA (p65), RelB, c-Rel, NF- κ B1 (p105/p50) y NF- κ B2 (p100/p52) (Silverman y Maniatis, 2001; Ghosh y Karin, 2002). La dimerización de las proteínas de la familia NF- κ B es necesaria para ejercer su función y pueden encontrarse múltiples combinaciones de homo o heterodímeros; por ejemplo, en piel (que es el tejido objeto de estudio de la presente memoria) los más abundantes son los dímeros p65/p50 y p50/p50 (Perez y cols., 2000). Estos dímeros se unen a secuencias consenso κ B presentes en los elementos reguladores de numerosos genes (factores de crecimiento, citoquinas, etc.), regulando su expresión. La actividad de NF- κ B se encuentra inhibida por proteínas de la familia I κ B. Hay cinco miembros en la familia I κ B con distintos grados de afinidad por los dímeros de NF- κ B: I κ B α , I κ B β , I κ B ϵ , I κ B γ y Bcl-3 (Ghosh y Karin, 2002; Li y Verma, 2002). Estas proteínas mantienen al factor NF- κ B en el citoplasma (incapaz por tanto de actuar como factor transcripcional) ya que enmascaran una de sus secuencias de localización nuclear (NLS) (Hayden y Ghosh, 2004). Por otra parte, en las secuencias de I κ B α y p65 existen secuencias de exportación nuclear (NES), lo que resulta en una constante circulación de los complejos I κ B α /NF- κ B entre el núcleo y el citoplasma, si bien su localización en ausencia de estímulo es preferentemente citosólica (Johnson y cols., 1999). Este equilibrio entre núcleo y citoplasma se ve alterado tras la degradación de I κ B α , dando lugar a una localización preferentemente nuclear de los dímeros NF- κ B, lo que se traduce en la activación transcripcional de los genes regulados por NF- κ B.

1.1.1 Estructura del complejo IKK

IKK α e IKK β son dos quinasas de residuos de serina o treonina de 85 y 87 KDa respectivamente; presentan un 52% de homología de secuencia y contienen dominios funcionales similares: un dominio N-terminal con actividad quinasa (KD), un motivo central tipo cremallera de leucina (*leucine-zipper*, LZ) implicado en la formación de homo o heterodímeros, y un dominio C-terminal tipo hélice-*loop*-hélice (HLH). IKK γ es una proteína de 47 KDa que carece de actividad quinasa y contiene un motivo de cremallera de leucina, un dominio tipo dedo de zinc (*zinc finger*, ZF) en el extremo C-terminal y dominios de espiral enrollada (*coiled-coil*, CC) en los extremos C- y N-terminal (figura 1).

Se ha descrito que IKK α e IKK β pueden formar homo y heterodímeros, siendo esta dimerización imprescindible para su actividad quinasa (Karin, 1999). Estudios *in vitro* indican que los heterodímeros IKK α /IKK β tienen mayor eficiencia catalítica que los homodímeros (Huynh y cols., 2000). El dominio HLH es esencial para la actividad de

IKK β y además está implicado en la regulación negativa de su actividad quinasas. IKK α e IKK β son capaces de fosforilar distintos miembros de la familia I κ B en múltiples sitios, aunque son más eficientes fosforilando I κ B α que I κ B β (Wu y Ghosh, 2003). Además, la actividad quinasas de IKK α es menos eficiente que la de IKK β y no puede reemplazarla (Regnier y cols., 1997). Las quinasas IKK α e IKK β también poseen otros sustratos diferentes, siendo p65 el más importante. Por otro lado, IKK α posee una secuencia de localización nuclear (NLS) importante para ejercer otras funciones, independientes del complejo IKK, en el núcleo celular (Sil y cols., 2004).

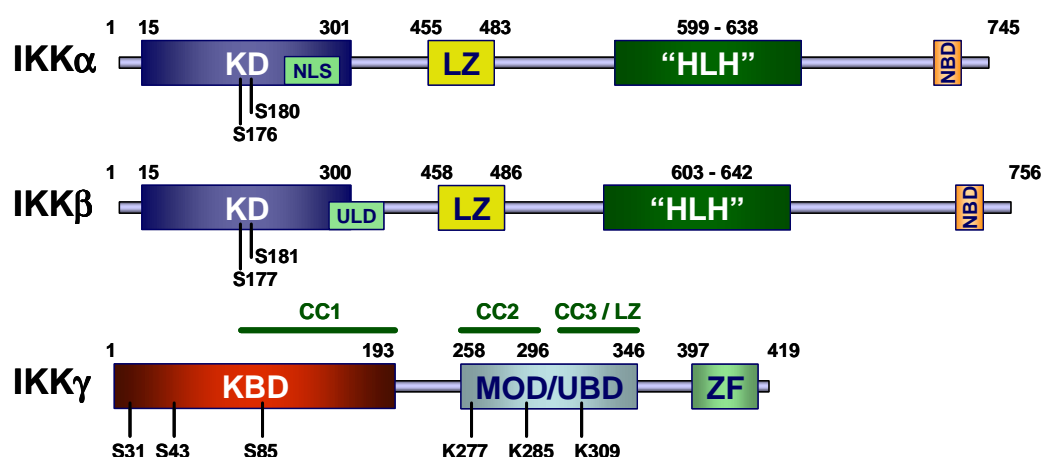


Figura 1. Representación esquemática de los dominios funcionales de IKK α , IKK β e IKK γ (NEMO). Se indican algunos de los sitios de fosforilación en serina (S) y ubiquitinación en lisina (K). NLS: secuencia de localización nuclear. NBD: dominio de unión a NEMO. ULD: dominio tipo ubiquitina. KBD: dominio de unión a quinasas, por el que interacciona con IKK α e IKK β . MOD: dominio de oligomerización. UBD: dominio de unión a ubiquitina. Adaptado de Scheidereit, 2006.

Ni la estequiometría del complejo IKK, ni todas las moléculas que lo forman, han sido determinadas todavía. Se han detectado complejos de 700-900 KDa formados por heterodímeros IKK α /IKK β asociados a IKK γ y se sabe además que la interacción alfa/beta es un requisito previo para la unión con la subunidad gamma (Rothwarf y cols., 1998; Rothwarf y Karin, 1999; Miller y Zandi, 2001). Sin embargo, la incertidumbre sobre la composición precisa del complejo se mantiene debido a que los modelos teóricos basados en el peso molecular de los componentes predicen un tamaño del complejo netamente inferior al observado experimentalmente, que es de 700-900 KDa (Hayden y Ghosh, 2004).

1.1.2 Funciones principales de las subunidades del complejo IKK

El complejo IKK desempeña funciones principalmente relacionadas con la señalización a través de la vía de NF- κ B, aunque recientemente se han descrito funciones independientes de esta vía de señalización para algunas de sus subunidades. Entre las

funciones en las que el complejo IKK está implicado, destacan las relacionadas con el sistema inmune (Bonizzi y Karin, 2004). Además, regula la expresión de genes importantes para el desarrollo y la fisiología de la glándula mamaria, piel, hueso y sistema nervioso central (Hayden y Ghosh, 2004). Concretamente en piel, se ha demostrado que el complejo IKK y la vía de señalización de NF- κ B desempeñan un papel relevante en la homeostasis cutánea, así como en procesos inflamatorios y tumorales, por lo que alteraciones en su función están asociadas a numerosas patologías de la piel como psoriasis, dermatitis alérgicas, displasias ectodérmicas, cilindromatosis hereditaria y otras patologías tumorales (Bell y cols., 2003).

1.1.2.1 Funciones de IKK α

Pese a las homologías estructurales y funcionales de IKK α e IKK β , estudios con ratones deficientes para estas proteínas han revelado que ambas son necesarias, estando implicadas en diferentes funciones fisiológicas. Los ratones deficientes en IKK α sufren muerte perinatal y presentan una piel hiperplásica con ausencia de diferenciación epidérmica terminal, así como alteraciones esqueléticas (Hu y cols., 1999; Li y cols., 1999a; Takeda y cols., 1999). Estudios con fibroblastos embrionarios de ratón (MEFs) deficientes en IKK α demuestran que éstos presentan valores normales de activación de IKK y de degradación del inhibidor I κ B por estímulos inflamatorios (Hu y cols., 1999). Se ha demostrado que la función principal de IKK α es la regulación de la diferenciación de epitelios estratificados, ya que el fenotipo en piel de los animales deficientes en IKK α se rescata por la expresión, mediante un transgén, de IKK α en las células basales de la piel –aunque estos animales mueren al poco tiempo de nacer al no expresar IKK α en el esófago– (Sil y cols., 2004). La regulación del desarrollo de la epidermis por IKK α se ejerce a través de un mecanismo no dependiente de NF- κ B, siendo la actividad quinasa de IKK α prescindible para la regulación de la diferenciación epidérmica, ya que formas mutantes de la proteína carentes de actividad quinasa revierten el fenotipo de los queratinocitos IKK $\alpha^{-/-}$ de forma equivalente a la forma salvaje (Hu y cols., 2001). Al trasplantar la piel de ratones neonatos con ausencia generalizada de IKK α sobre ratones inmunodeficientes (que les proporcionan el lecho dérmico en el que se expresa IKK α), se ha comprobado que los queratinocitos deficientes en IKK α son capaces de formar una epidermis con diferenciación terminal. Esto llevó a proponer que IKK α regularía la diferenciación de queratinocitos mediante un factor soluble, no identificado hasta ahora, denominado KDIF (*Keratinocyte Differentiation-Inducing Factor*), que actuaría de forma paracrina o autocrina induciendo su diferenciación (Hu y cols., 2001). Esta hipótesis se ha visto reforzada por el análisis de ratones en los que la ausencia de IKK α está

restringida específicamente a los queratinocitos, habiendo expresión de IKK α en las células de la dermis; estos animales desarrollan una piel aparentemente normal, en la que se distinguen varias capas. Sin embargo, los queratinocitos aislados son incapaces de diferenciar (Gareus y cols., 2007). Estos autores establecen que IKK α tiene un papel fundamental en la regulación de la función barrera epidérmica, controlando la expresión de genes cruciales para el procesamiento de lípidos del estrato córneo y para el mantenimiento de la integridad de las uniones celulares (Gareus y cols., 2007). Por otra parte, estos experimentos pudieron aclarar que las alteraciones esqueléticas presentes en los ratones IKK $\alpha^{-/-}$ no son debidas directamente a la ausencia de IKK α en estas estructuras, sino que son secundarias a la falta de diferenciación epidérmica, ya que la morfogénesis esquelética requiere una epidermis perfectamente diferenciada (Sil y cols., 2004; Gareus y cols., 2007).

Aparte de las funciones descritas anteriormente para IKK α , independientes de la vía de NF- κ B, es importante destacar la relevancia de la actividad catalítica de IKK α en la regulación de la actividad de NF- κ B. Así, el procesamiento de p100 –que da lugar a la proteína p52 y es crucial, por tanto, para la formación del dímero RelB/p52– es dependiente de IKK α y de la quinasa NIK, y es esencial para el desarrollo y mantenimiento de órganos linfoides (Senftleben y cols., 2001; Yamamoto y Gaynor, 2004). También es fundamental la actividad catalítica de IKK α durante el desarrollo de la glándula mamaria, como intermediario en la señalización de RANK y RANK ligando sobre NF- κ B y ciclina D1 (Cao y cols., 2001). Además, IKK α puede fosforilar y estabilizar a β -catenina favoreciendo su unión al promotor de *ciclina D1*, actuando así como co-activador de su transcripción (Lamberti y cols., 2001; Albanese y cols., 2003; Carayol y Wang, 2006), aunque también se ha observado que puede inducir la degradación de ciclina D1 mediante su fosforilación directa (Kwak y cols., 2005). Finalmente, IKK α actúa como regulador negativo en la activación de macrófagos asociada a infección, contribuyendo a la finalización del proceso inflamatorio inducido fundamentalmente a través de la señalización de NF- κ B (Lawrence y cols., 2005).

Otra característica conocida recientemente para IKK α , que la distingue del resto de subunidades del complejo, es su capacidad para actuar en el núcleo celular como quinasa de la histona H3, modificando de esta manera la transcripción de determinados genes que responden a NF- κ B (Anest y cols., 2003; Yamamoto y cols., 2003). Por otro lado, muchos de los genes regulados por NF- κ B se encuentran en un estado reprimido debido a la unión de complejos represores, formados, entre otros, por elementos como NCoR, SMRT, homodímeros de p50 y deacetilasas de histonas (HDAC). Ante estímulos inductores, se produce la remodelación de estos complejos permitiendo el acceso de

factores activadores como Bcl-3 o p65 y el reclutamiento de acetiltransferasas de histonas (Scheidereit, 2006). IKK α , mediante fosforilación de SMRT, participa en la activación transcripcional de determinados genes como *cIAP2* o *IL-8*, favoreciendo el intercambio de complejos represores por activadores (Hoberg y cols., 2004). También se ha descrito una función nuclear de IKK α en la regulación de la expresión de genes que no son dianas de NF- κ B, como *hes1* (regulador de Notch). En este caso en particular, I κ B α se encuentra asociado al complejo represor de *hes1*; IKK α fosforila a I κ B α de forma que causa su liberación, permitiendo así la acetilación del promotor y el aumento de la transcripción del gen *hes1* (Aguilera y cols., 2004).

1.1.2.2 Funciones de IKK β

A diferencia de IKK α , la subunidad IKK β es fundamental para la activación de NF- κ B en respuesta a estímulos inflamatorios (Delhase y cols., 1999). Los ratones deficientes en IKK β son letales embrionarios a día 14.5 de gestación (E14.5), presentando apoptosis hepática masiva, hemorragias y degeneración de hepatocitos (Li y cols., 1999b; Li y cols., 1999c; Tanaka y cols., 1999). Los MEFs deficientes en IKK β presentan menor activación de NF- κ B en respuesta a estímulos pro-inflamatorios como TNF- α e IL-1 (Li y cols., 1999b), indicando que el papel de IKK β es fundamental en el establecimiento de la inflamación como respuesta a estos estímulos. El fenotipo de los ratones deficientes en IKK β se rescata por inactivación del receptor de TNF- α (TNFR), por lo que se concluye que la apoptosis es debida a la señalización por TNF- α (Li y cols., 1999b). Estos datos, junto con otros estudios, ponen de manifiesto que la principal función de IKK β es la activación de NF- κ B en respuesta a estímulos inflamatorios (Tanaka y cols., 1999).

1.1.2.3 Funciones de IKK γ

La subunidad IKK γ es fundamental para la función quinasas del complejo IKK, a través de la vía clásica de señalización de NF- κ B (Hayden y Ghosh, 2004). La deficiencia de IKK γ en ratones conduce a letalidad embrionaria en el día 12.5 de gestación por apoptosis hepática severa (Rudolph y cols., 2000). Los MEFs deficientes en IKK γ no presentan actividad IKK detectable, indicando que aunque esta subunidad no tiene actividad catalítica, es esencial para la activación de NF- κ B y para prevenir la apoptosis inducida por TNF- α (Makris y cols., 2000). El gen que codifica para IKK γ está en el cromosoma X, de manera que las hembras IKK $\gamma^{+/-}$, portadoras de un alelo salvaje y otro con una mutación nula, contienen un mosaico de células con ausencia o presencia de

IKK γ , como consecuencia de la inactivación al azar de uno de los cromosomas X. Mutaciones en el gen IKK γ en humanos causa la enfermedad *incontinentia pigmenti* (IP), caracterizada por la presencia de inflamación severa en zonas de la piel, lesiones hiperqueratóticas y áreas de hiperpigmentación y pigmentación deficiente con extensión variable. Los ratones deficientes en IKK γ son un buen modelo de esta enfermedad.

1.1.3 Mecanismos de regulación del complejo IKK y de NF- κ B. El gen CYLD

El complejo IKK es activado por fosforilación en dos serinas conservadas de IKK α (Ser 176 y 180) o IKK β (Ser 177 y 181), localizadas en el dominio KD (Delhase y cols., 1999), por mecanismos que todavía se encuentran en discusión. Por un lado, diferentes estudios indican que la fosforilación está mediada por quinasas de la familia de las MAP3K, como MEKK1 (MAP/ERK quinasa quinasa 1), MEKK3, NIK o TAK1, que se encuentran por encima del complejo IKK en la vía de señalización de NF- κ B. Por otro lado, IKK podría ser reclutado hacia la membrana, por complejos multiméricos que incluyen proteínas como RIP y miembros de la familia TRAF, lo que causaría activación del complejo por auto-fosforilación de sus subunidades alfa y beta (Hayden y Ghosh, 2004; Yamamoto y Gaynor, 2004).

Aparte de los procesos de fosforilación, la ubiquitinación de factores que regulan el complejo IKK supone un mecanismo crucial para la modulación de la actividad de la vía de señalización de NF- κ B. La adición de moléculas de ubiquitina a través de uniones en residuos de lisina 48 (Ub^{Lys48}) tiene como consecuencia la degradación por medio del proteosoma de la proteína marcada, mientras que la formación de cadenas de ubiquitina mediante uniones en residuos de lisina 63 (Ub^{Lys63}) modifica la actividad de la proteína poliubiquitinada sin ser degradada. Estudios recientes muestran que varios componentes de la vía de señalización de NF- κ B actúan como ubiquitin-ligasas, sustratos de ubiquitin-ligasas o ambos (Ben-Neriah, 2002). Así, IKK γ es poliubiquitinada en respuesta a la estimulación por TNF- α en un proceso mediado por TRAF2 (Tang y cols., 2003). Por otro lado, también participan en la regulación de NF- κ B proteínas con función de-ubiquitinizante, es decir, enzimas capaces de hidrolizar las cadenas de poliubiquitina de forma que contrarrestan el proceso de activación a través de TNF- α . En este sentido, se ha descrito que la proteína CYLD (supresor tumoral cuya mutación es causante del síndrome cilindromatosis familiar) es capaz de interaccionar con IKK γ y TRAF2, eliminando selectivamente las cadenas de ubiquitina unidas a través de residuos de lisina 63. La pérdida de función de CYLD resulta en un incremento de la ubiquitinación de TRAF2, la activación patológica del complejo IKK y NF- κ B y la aparición de patologías

tumorales (Brummelkamp y cols., 2003; Kovalenko y cols., 2003; Trompouki y cols., 2003).

NF- κ B es activado por una gran variedad de estímulos como citoquinas pro-inflamatorias (TNF- α e IL-1), infecciones virales y bacterianas, radiación UV y agentes inductores de estrés. Se han descrito principalmente dos vías de activación de NF- κ B (figura 2) (Scheidereit, 2006):

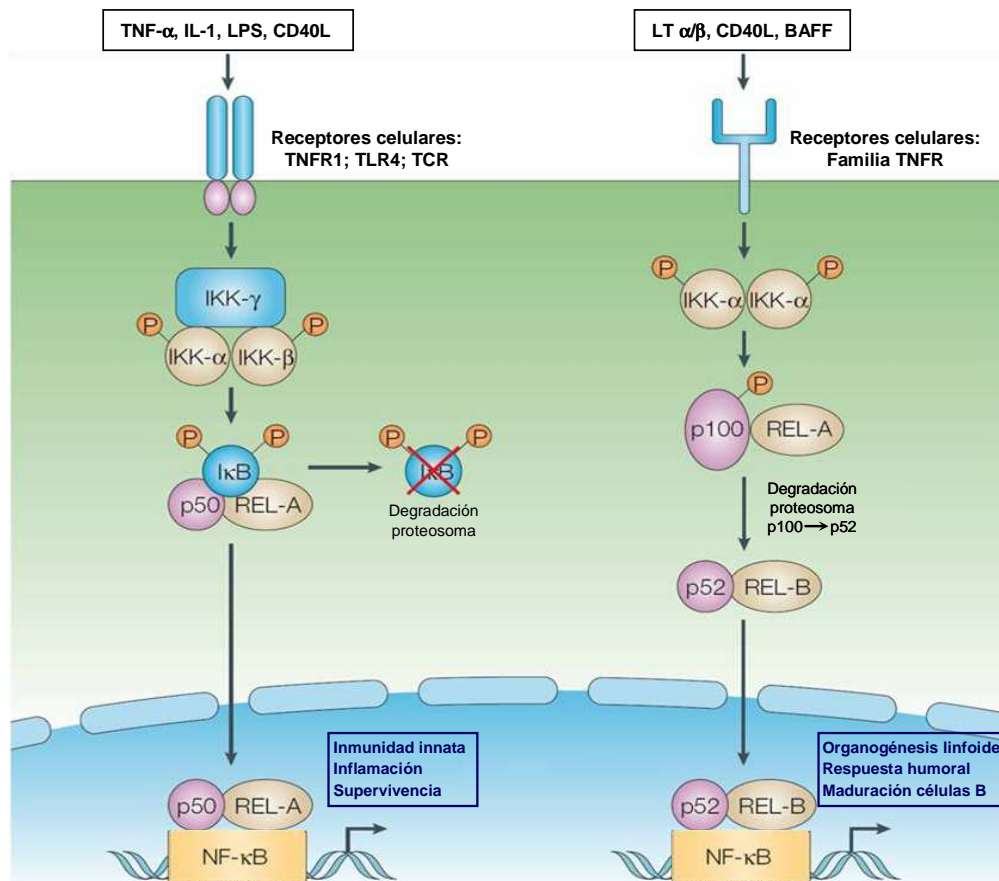


Figura 2. Principales vías de activación de NF- κ B. La vía clásica (izquierda) se inicia principalmente tras la señalización por TNF- α y la vía alternativa (derecha) a través de ligandos como LT $\alpha\beta$, CD40L o BAFF. LPS: Lipopolisacárido. Adaptado de Karin y Greten 2005.

1) La vía clásica de señalización (también denominada canónica) desempeña un papel crítico en la respuesta inmune innata y adaptativa a través de diferentes vías, como TNF- α (Aggarwal, 2003), receptores Toll-like (TLR) (Barton y Medzhitov, 2003) o receptores de células T (TCR) (Ruland y Mak, 2003). La activación es dependiente de la degradación de I κ B, donde las subunidades IKK β e IKK γ juegan un papel fundamental (Silverman y Maniatis, 2001; Bonizzi y Karin, 2004). La señalización por TNF- α posiblemente sea la más estudiada y se inicia principalmente a través de su receptor

TNFR1, que interacciona con proteínas adaptadoras como TRADD (gracias a dominios de unión tipo *death domain*), TRAF2 (Rothe y cols., 1994) y proteínas con actividad quinasa (RIP y MEKK3) (Poyet y cols., 2000) y que en conjunto producen el reclutamiento y fosforilación del complejo IKK (Devin y cols., 2001), lo que causa la fosforilación del represor I κ B, su poliubiquitinación y degradación por el proteosoma (Li y Verma, 2002). De este modo, los dímeros NF- κ B son liberados y migran al núcleo, donde participan en la activación transcripcional de sus genes diana.

2) La vía alternativa de activación de NF- κ B (también denominada no-canónica) es fundamental en la expresión de genes implicados en el desarrollo y mantenimiento de órganos linfoides. Es exclusivamente dependiente de homodímeros formados por IKK α y no requiere la formación del complejo IKK (Bonizzi y Karin, 2004; Hayden y Ghosh, 2004). Es activada en respuesta a citoquinas como linfotóxina LT β , el factor de activación de células B (BAFF) o el ligando CD40, de forma que se produce la fosforilación y procesamiento de p100, proceso crucial para la modulación del dímero RelB/p52. La quinasa NIK es la responsable de la fosforilación y activación de IKK α (Senftleben y cols., 2001).

El gen *CYLD* codifica para una proteína de 107 KDa que posee en su región C-terminal un dominio con actividad hidrolasa de cadenas de poliubiquitina unidas a través de residuos de lisina 63. Se ha descrito que CYLD interacciona con miembros de la familia TRAF (como TRAF2 y TRAF6) e IKK γ , causando la disociación del complejo IKK (Brummelkamp y cols., 2003; Kovalenko y cols., 2003; Trompouki y cols., 2003). La pérdida de actividad de CYLD produce un aumento en la señalización de NF- κ B tras la estimulación con TNF- α , así como una mayor resistencia a la muerte celular por apoptosis (Brummelkamp y cols., 2003), lo que indica que CYLD actúa como un regulador negativo de la vía de señalización de NF- κ B (figura 3). A pesar de que CYLD se expresa de forma ubicua en todos los tejidos, se conoce poco acerca de cual es la función que desempeña. Se han generado en varios laboratorios ratones portadores de diferentes mutaciones o deleciones en CYLD. Estos animales, aunque carentes de un fenotipo obvio, han revelado la implicación de CYLD en el desarrollo de timocitos. Además, poseen incrementada la señalización a través del receptor TCR, lo que conduce al desarrollo espontáneo de inflamación intestinal debido a una respuesta anómala de las células T (Reiley y cols., 2006). En pacientes humanos, la falta de función de CYLD es responsable de la cilindromatosis familiar (también denominada síndrome de tumores en turbante o síndrome de Brooke-Spiegler). Es un síndrome autosómico dominante caracterizado por el desarrollo de numerosos tumores benignos, denominados cilindromas, originados en apéndices de la piel (folículos pilosos y glándulas asociadas). Se cree que provienen de células ecrinas o apocrinas de la piel, desarrollándose en zonas

del cuerpo con pelo –aproximadamente el 90% son de cabeza– (Bignell y cols., 2000). La cilindromatosis familiar es una enfermedad rara, con penetrancia variable, y que afecta con mayor frecuencia a las mujeres que a los hombres. Además, la misma mutación origina en distintos individuos de la misma familia diferente fenotipo tumoral (cilindromas, tricoepiteliomas y espiroadenomas ecrinos) (Poblete Gutierrez y cols., 2002; Bowen y cols., 2005). Estos tumores son mayoritariamente benignos, aunque se han descrito casos de malignización y metástasis (Gerretsen y cols., 1995). Esta enfermedad puede causar desfiguraciones de rostro y cabeza, llegando a requerirse, en los casos más severos, reconstrucciones utilizando injertos de piel.

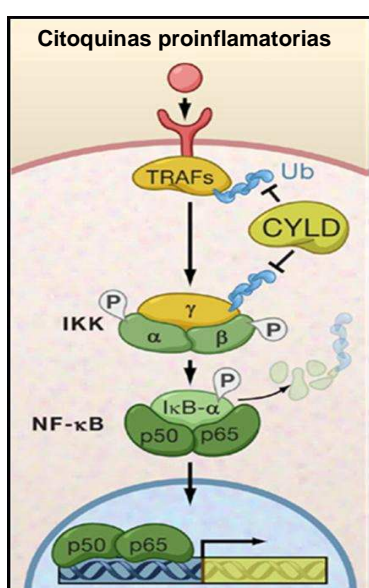


Figura 3. CYLD en la regulación de la vía de señalización NF-κB. Esquema representativo de la vía canónica de señalización de NF-κB inducida por citoquinas pro-inflamatorias. Los sustratos de CYLD que se muestran son proteínas de la familia TRAF (como TRAF2 y TRAF6) e IKKγ. Adaptado de Ikeda y Dikic, 2006.

El gen *CYLD* se encuentra en la región cromosómica 16q12-q13 (Biggs y cols., 1995; Bignell y cols., 2000). Aproximadamente en el 70% de los casos de cilindromas familiares se observa pérdida de heterocigosidad (LOH) en esa región y en todos los casos el alelo perdido es el alelo no mutado heredado del parental que no porta la mutación. Este patrón de pérdida de función es característico de los genes supresores de tumores (oncogenes recesivos). La pérdida de heterocigosidad en la región cromosómica 16q también se encuentra en una gran proporción de los cilindromas esporádicos (Biggs y cols., 1996). La mayoría de las alteraciones identificadas en el gen *CYLD* se corresponden con mutaciones que llevan a cambios en la pauta de lectura, originándose una proteína truncada sin dominio catalítico funcional (Bignell y cols., 2000; Poblete Gutierrez y cols., 2002; Hu y cols., 2003).

1.2 La piel

1.2.1 Características generales de la piel

La función principal de la piel es la de proporcionar al organismo una barrera de protección contra agentes nocivos externos. La piel es un órgano bien compartimentalizado, formado por la epidermis (capa más externa), la dermis subyacente y la hipodermis. La dermis es un tejido conectivo que actúa de soporte. Sus componentes fundamentales son las fibras de colágeno y elastina. Además, encontramos fibroblastos, monocitos, macrófagos, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y terminaciones nerviosas. Contiene estructuras especializadas de origen ectodérmico, como son los folículos pilosos y las glándulas sebáceas y sudoríparas.

La epidermis es un epitelio escamoso estratificado y queratinizado en constante renovación. Se encuentra constituido por diferentes poblaciones celulares: queratinocitos, melanocitos, células de Langerhans y células de Merkel, siendo el queratinocito el más abundante. Los melanocitos son responsables de la pigmentación de la piel, mientras que las células de Langerhans son un tipo de células dendríticas originadas en la médula ósea que cumplen funciones inmunológicas. Por último, las células de Merkel, localizadas en el estrato basal, tienen una función de carácter sensorial. Como resultado de un complejo proceso de proliferación y diferenciación los queratinocitos se organizan en cuatro estratos (figura 4) (Fuchs, 1990):

- El estrato basal contiene las células con capacidad proliferativa de la epidermis, responsables de la renovación continua de los queratinocitos epidérmicos.
- El estrato espinoso presenta complejos de adhesión intercelular denominados desmosomas que contribuyen a la integridad y a la función barrera de la epidermis. Las células de este estrato normalmente ya no se dividen, aunque no han perdido completamente su capacidad proliferativa. También se expresan algunas proteínas de la envuelta celular como la involucrina.
- El estrato granuloso se caracteriza por la presencia de gránulos intracelulares de queratohialina formados por proteínas como la profilagrina y gránulos lamelares que le confieren su aspecto característico; el contenido lipídico de estos gránulos es liberado al espacio intercelular, contribuyendo a la función protectora de la epidermis. Otras proteínas como la loricrina y la filagrina también se expresan en este estrato.
- El estrato córneo representa el estado final del proceso de diferenciación de los queratinocitos. Está formado por escamas (que se corresponden a células enucleadas y sin orgánulos, los corneocitos) suspendidas en una matriz lipídica, constituyendo una estructura impermeable e insoluble responsable de la función protectora de la epidermis. El proceso de descamación implica la degradación de los lípidos de los espacios intercelulares y la pérdida de las interconexiones desmosomales residuales.

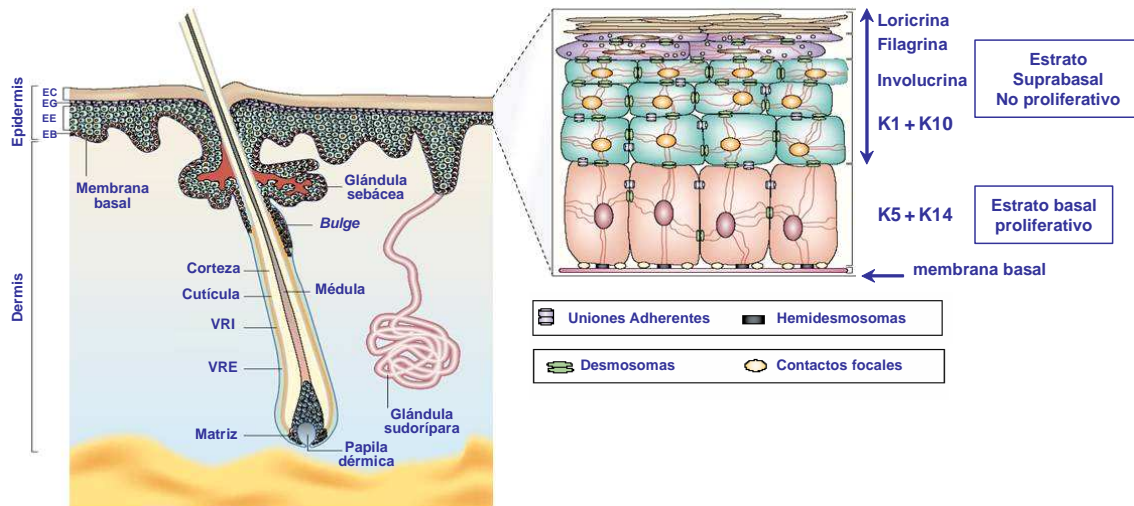


Figura 4. La piel y sus apéndices. Esquema de la piel y de estructuras anejas: folículo piloso, glándulas sebáceas y sudoríparas. Se representan los diferentes estratos que forman la epidermis (estrato basal, EB; espinoso, EE; granuloso, EG y córneo, EC) y se especifican, en cada uno de ellos, las proteínas marcadoras de diferenciación que se expresan en los mismos. VRI: vaina radicular interna. VRE: vaina radicular externa. K: queratina. Adaptado de Fuchs y Raghavan 2002.

1.2.2 Diferenciación epidérmica

El proceso de diferenciación epidérmica está acompañado de la expresión secuencial de diferentes proteínas tanto enzimáticas como estructurales que pueden usarse como marcadores de diferenciación del queratinocito. Los filamentos intermedios que conforman el citoesqueleto de las células epiteliales (epidérmicas y no epidérmicas) están formados por las queratinas, familia de proteínas con más de veinte miembros que se expresan en pares característicos y que presentan especificidad tisular y celular en su expresión (Fuchs y Green, 1980; Moll y cols., 1982). Así, en la epidermis, las células del estrato basal expresan las queratinas 5 y 14 (K5 y K14). Sin embargo, en estratos superiores estas proteínas son reemplazadas por las queratinas 1 y 10 (K1 y K10), características por tanto de células suprabasales (figura 4). La transglutaminasa, loricrina y filagrina son marcadores característicos de diferenciación epidérmica terminal (Rice y Green, 1979; Dale, 1985; Mehrel y cols., 1990). La epidermis debe mantener un equilibrio entre la proliferación celular y la pérdida de células por diferenciación terminal y descamación. Las alteraciones en la homeostasis celular y en la respuesta a agresiones llevan a patologías tales como neoplasias cutáneas y enfermedades inflamatorias de la piel, de gran relevancia médica.

Durante la morfogénesis epidérmica, las uniones intercelulares y a la matriz extracelular son cruciales para el establecimiento del epitelio y el control de los cambios dinámicos que ocurren en el proceso de diferenciación, así como en el mantenimiento de la homeostasis y polaridad tisular (Fuchs y Raghavan, 2002). La adhesión célula-célula

se produce principalmente a través de tres tipos de uniones: uniones adherentes (AJs), uniones estrechas y desmosomas (Tsukita y Furuse, 2002; Perez-Moreno y cols., 2003; Getsios y cols., 2004), constituyendo los llamados complejos de unión intercelular. Estos complejos contienen receptores transmembrana que median la unión célula-célula en el espacio extracelular y determinan la especificidad de la respuesta intracelular. Además, las proteínas citoplasmáticas asociadas a los receptores median la conexión con el citoesqueleto y establecen líneas moleculares de comunicación con otras uniones célula-célula. La conexión entre estas uniones y el citoesqueleto permite a un epitelio funcionar como un tejido perfectamente coordinado (Perez-Moreno y cols., 2003). Las cadherinas constituyen una familia de proteínas transmembrana de adhesión intercelular dependientes de calcio e implicadas en el establecimiento de uniones adherentes (Yap y cols., 1997; Jamora y Fuchs, 2002). Cadherina-E es el miembro más representativo en epitelios y se ha demostrado que es una proteína esencial para la diferenciación epidérmica. La pérdida de expresión de cadherina-E impide en células ES la agregación celular y es letal en la embriogénesis temprana (Larue y cols., 1994). Además, diferentes estudios de delección específica de cadherina-E en epitelios estratificados demuestran que es esencial en el desarrollo epidérmico y la diferenciación terminal de los queratinocitos, así como durante la morfogénesis folicular (Jensen y cols., 1997; Young y cols., 2003; Tinkle y cols., 2004; Tunggal y cols., 2005). Cadherina-E tiene un papel muy relevante en los procesos neoplásicos; se ha observado que la disminución o pérdida de expresión de cadherina-E está relacionada con la progresión y metástasis de ciertos tipos de tumores, incluidos tumores de piel (Birchmeier y Behrens, 1994; Berx y cols., 1998). Recíprocamente, el restablecimiento de la expresión de cadherina-E en líneas celulares tumorales de origen epitelial tiene como consecuencia la reversión de un fenotipo invasivo a otro benigno (Vleminckx y cols., 1991). Esto indica que cadherina-E se comporta como un gen supresor del fenotipo tumoral invasivo. A este respecto, se ha establecido que la invasión de células tumorales está asociada con la pérdida de expresión de genes epiteliales, como cadherina-E, y la ganancia de expresión de genes mesenquimales (Batlle y cols., 2000; Cano y cols., 2000), mediante un proceso equivalente a la transición epitelio-mesénquima (TEM) que ocurre durante el desarrollo embrionario. Las uniones adherentes conectan la membrana celular con los microfilamentos de actina. Para ello, el dominio intracelular de cadherina-E se une a β -catenina, que a su vez se une a α -catenina. Esta interacción media el acoplamiento del citoesqueleto intracelular de actina con las células adyacentes (figura 5) (Jamora y Fuchs, 2002). β -catenina, dependiendo de su localización intracelular, puede desempeñar una función tanto en adhesión como en señalización intracelular, concretamente de la vía de Wnt/Lef (Huelsken y Behrens, 2002). En ratones *knockout* se ha descrito que la pérdida de β -catenina tiene consecuencias sobre la morfogénesis folicular, la diferenciación

terminal de los queratinocitos y el balance entre proliferación y muerte celular (Huelsken y cols., 2001).

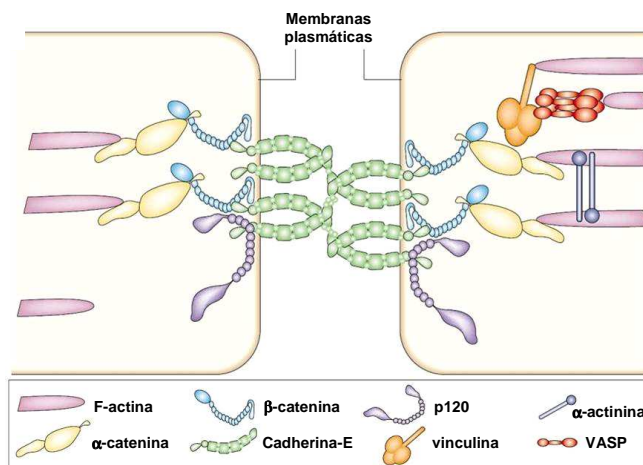


Figura 5. Representación esquemática de las proteínas que forman parte de las uniones adherentes. Adaptado de Fuchs y Raghavan 2002.

Otra molécula que interacciona con las cadherinas y α -catenina es placoglobina (γ -catenina). Dicha molécula está íntimamente relacionada con β -catenina, pudiéndola reemplazar en las AJs, aunque se encuentra principalmente en los desmosomas (Getsios y cols., 2004). Además, es una proteína relevante en la diferenciación epidérmica e incluso se han asociado alteraciones en su expresión con determinadas patologías epidérmicas tan frecuentes como el pénfigo vulgar (enfermedad autoinmune severa caracterizada por la presencia de acantolisis epidérmica suprabasal; la acantolisis es la pérdida de cohesión entre los queratinocitos, con formación de una vesícula o ampolla intraepidérmica como resultado de la destrucción de los desmosomas intercelulares) (Caldelari y cols., 2001). Igualmente, se han identificado en humanos mutaciones en el gen *placoglobina* que dan lugar a la enfermedad rara conocida como mal de Naxos, caracterizada por una cardiomiopatía ventricular, queratoderma palmoplantar y presencia de pelo lanoso (McKoy y cols., 2000).

1.2.3 El folículo piloso

En la piel se encuentran varios tipos de apéndices ectodérmicos con funciones muy diversas. De especial interés para nosotros son los folículos pilosos (figura 6); los folículos surgen como derivados de la epidermis, y en su morfogénesis intervienen señales moleculares entre el epitelio y el mesénquima mesodérmico subyacente (Hardy, 1992; Fuchs y cols., 2001; Rogers, 2004; Alonso y Fuchs, 2006). Entre las vías de señalización implicadas en el desarrollo del folículo piloso, se encuentran las vías de Wnt/ β -catenina (Alonso y Fuchs, 2003), TGF β /BMP (Botchkarev, 2003) y Sonic hedgehog (St-Jacques y cols., 1998). En particular, en el tema que nos ocupa, se ha

observado que tanto la pérdida de cadherina-E como de β -catenina, tienen un fuerte impacto sobre la morfogénesis folicular. Así, los ratones con ausencia de cadherina-E en la epidermis sufren una pérdida progresiva de los folículos pilosos (además de presentar anomalías en la forma y tamaño de los mismos), lo cual indica la importancia de cadherina-E en el ciclo continuo de crecimiento de los folículos pilosos (Young y cols., 2003; Tinkle y cols., 2004). En el caso de β -catenina, su delección específica en epitelios estratificados demuestra el papel fundamental de esta molécula no sólo en el mantenimiento de los folículos, sino también en el control del destino de las células madre de la piel hacia un linaje folicular o epidérmico (Huelsken y cols., 2001).

Numerosas patologías cursan con alteraciones de los folículos pilosos en el ser humano, como son la alopecia, acné, forúnculos, hirsutismo o la enfermedad de Verneuil entre otros. Además, es importante destacar la implicación de los folículos pilosos en el desarrollo de tumores de piel, bien sean del propio folículo como los tricoepiteliomas, pilomatricomas o carcinomas triquilemales, u otros tipos tumorales de los que se ha propuesto que se originan a partir de los folículos pilosos, tanto en humanos como en modelos animales (Hansen y Tennant, 1994).

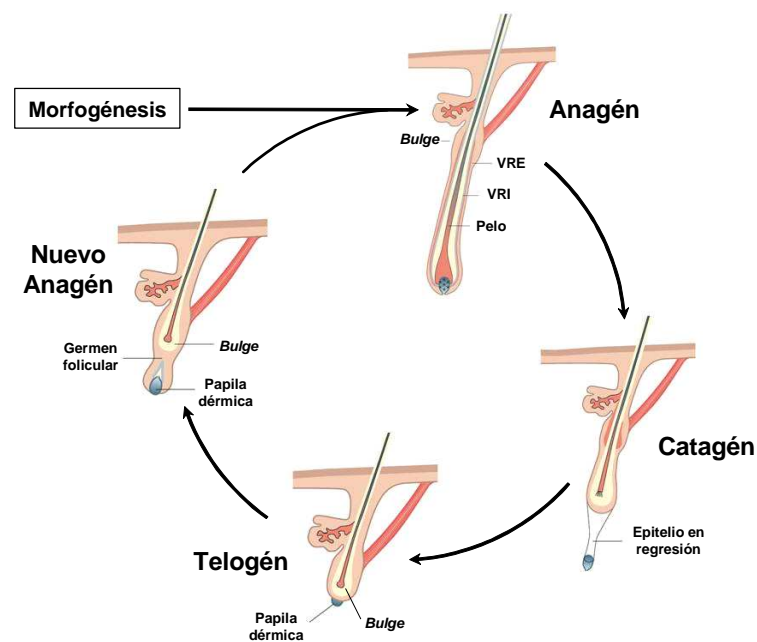


Figura 6. Etapas del ciclo folicular. Representación esquemática de las características morfológicas de las distintas fases del proceso de ciclaje. Adaptado de Fuchs, 2007.

A lo largo de la vida, el folículo piloso sufre una serie de cambios cíclicos que guardan similitud con el proceso de su morfogénesis (Hardy, 1992; Fuchs y cols., 2001; Alonso y Fuchs, 2003). Como se representa en la figura 6, cada ciclo se divide en tres etapas: 1) Anagén: fase activa o de crecimiento. El folículo crece y penetra en la capa grasa subdérmica. 2) Catagén: fase de regresión donde el folículo involucre hacia la zona subepidérmica, quedando reducido hasta un tercio de su tamaño. 3) Telogén: fase de

quiescencia del folículo. En el ratón, no se observan folículos anagénicos maduros hasta varios días después del nacimiento; todos los folículos ciclan de forma sincronizada durante los dos primeros ciclos, perdiéndose la sincronización en ciclos posteriores (Fuchs y cols., 2001).

1.3 Tumorigénesis de piel

La piel, y en especial la epidermis, está expuesta a numerosos agentes físicos y químicos que son potencialmente carcinogénicos. Además, es un órgano en constante renovación, donde hay células con capacidad de dividirse a lo largo de la vida del individuo, por lo que alteraciones en el control de su proliferación y diferenciación pueden provocar procesos neoplásicos. De hecho, el cáncer de piel es el tumor más frecuente en occidente y representa aproximadamente la mitad de todos los casos de cáncer diagnosticados; su incidencia está aumentando más rápidamente que cualquier otro tipo de cáncer, posiblemente por una mayor exposición a los rayos ultravioleta del sol. Las tres formas de cáncer de piel más frecuentes son (Abdel-Malek, 2005):

1) El carcinoma basocelular o de células basales (BCC), que representa el 75% de los casos (figura 7-A). Estos tumores suelen ser de crecimiento lento y rara vez se extienden a otras partes del cuerpo. No obstante, si se dejan sin tratamiento, pueden extenderse a los tejidos circundantes y a los huesos.

2) El carcinoma epidermoide o de células escamosas (SCC), que representa el 20% de todos los casos de cáncer de piel, presenta un mayor grado de infiltración y metástasis que en el caso de los BCCs (figura 7-B). Aparece frecuentemente en las áreas del cuerpo expuestas al sol, como la cara, el cuello y el dorso de las manos, aunque también se puede desarrollar en otras zonas como consecuencia de ulceraciones o inflamaciones de la piel. Los carcinomas epidermoides pueden ser muy agresivos y metastásicos y se pueden clasificar en distintas variantes histológicas según su grado de diferenciación y patrón de crecimiento. Se han descrito diversas variantes histológicas: SCC fusiforme, SCC acantolítico o pseudoglandular (ASCC, que se caracteriza por la presencia de acantocitos o queratinocitos que han perdido las uniones celulares; figura 7-C), SCC pseudovasculoso, enfermedad de Bowen, carcinoma verrucoso y carcinoma desmoplásico (Petter y Haustein, 2000). La identificación temprana y la confirmación mediante una biopsia del tipo de SCC, así como la selección del correcto tratamiento pueden reducir la mortalidad de los pacientes que sufren este tipo de tumores. Así por ejemplo, los carcinomas verrucosos rara vez metastatizan, pero pueden volverse más agresivos si se tratan con radioterapia (Miller, 2000), la cual está contraindicada. Asimismo, en ciertas ocasiones existen dificultades en el diagnóstico diferencial entre SCCs y otras lesiones como pueden ser angiosarcomas, adenocarcinomas o sarcomas.

Por todo ello, es importante avanzar en el estudio de los factores y mecanismos implicados en el desarrollo de las distintas variantes histológicas de SCCs, ya que su conocimiento es todavía muy limitado.

3) El melanoma, que es el tipo de cáncer de piel menos común (aproximadamente el 4% del total). Se origina en los melanocitos y suele presentar un comportamiento agresivo con alta capacidad de metastatizar; es por ello responsable del 79% de las muertes por cáncer cutáneo (figura 7-D).

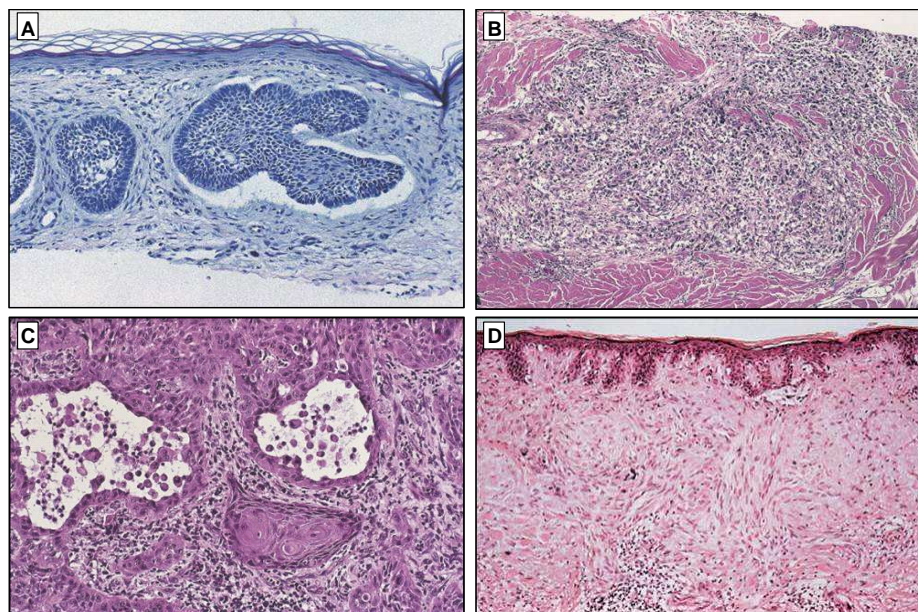


Figura 7. Aspecto histológico de distintos tipos de cáncer de piel. (A) Carcinoma basocelular (BCC). (B) Carcinoma epidermoide o de células escamosas (SCC). (C) Carcinoma epidermoide acantolítico (ASCC). (D) Melanoma maligno.

1.3.1 Aproximaciones para el estudio de la carcinogénesis de piel

1.3.1.1 Carcinogénesis química en piel de ratón

Muchos de los estudios encaminados a desvelar los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de las neoplasias cutáneas se han realizado utilizando modelos animales. Los modelos de carcinogénesis química en piel de ratón son fundamentales para el estudio de los mecanismos moleculares que subyacen a la formación y crecimiento tumoral, así como a los procesos de invasión tumoral. En el proceso de carcinogénesis química en dos pasos se distinguen tres etapas de desarrollo del tumor: iniciación, promoción y conversión maligna (Slaga y cols., 1996).

La iniciación se consigue con la aplicación tópica de un carcinógeno, generalmente DMBA. Este tratamiento ocasiona un daño genético irreversible. La promoción se induce mediante la aplicación repetida, de forma tópica, de un éster de

forbol, generalmente TPA, lo que causa hiperproliferación epidérmica. Esta fase es inicialmente reversible y conduce a la aparición de lesiones premalignas conocidas como papilomas escamosos. Algunas de estas lesiones premalignas pueden regresar de forma espontánea. La conversión se produce cuando algunos de estos papilomas escamosos sufren una transición a carcinomas de células escamosas o epidermoides, con un grado de agresividad mayor. Estos carcinomas a su vez pueden clasificarse según su grado de malignidad y de diferenciación en tres subtipos: muy diferenciado, moderadamente diferenciado y poco diferenciado. Finalmente, los carcinomas epidermoides pueden progresar a carcinomas fusiformes, muy indiferenciados y altamente metastásicos. Durante las distintas etapas de la progresión tumoral, se producen cambios en la expresión génica que generalmente implican mutaciones en proto-oncogenes o genes supresores de tumores. Entre ellos, se han identificado mutaciones en el gen Harvey-*ras* asociadas a la formación de papilomas (Quintanilla y cols., 1986). Otros cambios asociados al *locus* Ha-*ras* incluyen trisomías para el alelo mutado y la pérdida del alelo silvestre (Bianchi y cols., 1990; Bremner y Balmain, 1990). La transición a carcinomas se caracteriza por la pérdida funcional del alelo *Ink4a/Arf* (que codifica para las proteínas p16 y p19) o la presencia de alteraciones en el cromosoma 11 que implican al gen supresor *p53* (Klein-Szanto, 1989; Ruggeri y cols., 1991).

En el paso de los tumores de piel a través de los distintos grados de malignidad, se producen cambios en la expresión de queratinas que son frecuentemente utilizados como marcadores en la caracterización histológica del tumor. Así, se ha comprobado que los papilomas expresan queratinas típicas de epitelios hiperproliferativos (K6/K16), además de expresar las queratinas de capas basales y suprabasales (K5/K14 y K1/K10, respectivamente). Durante la progresión hacia un fenotipo más indiferenciado, la expresión de la pareja de queratinas K1/K10 disminuye, mientras que se mantiene la expresión del resto (Roop y cols., 1988). En los papilomas premalignos, se detecta la expresión de K13 (Winter y cols., 1990), mientras que la expresión de K8, queratina característica de epitelios simples, aparece cuando se produce la conversión a carcinomas (Larcher y cols., 1992; Casanova y cols., 2004). Por último, la conversión a carcinomas fusiformes está determinada por la pérdida de expresión de queratinas y marcadores epiteliales de diferenciación como cadherina-E, adquiriéndose un fenotipo mesenquimal caracterizado por la activación de ciertos genes como *snail* y *slug* (Cano y cols., 2000).

Los animales transgénicos Tg.AC (Leder y cols., 1990) suponen un modelo de interés para el estudio de la tumorigénesis cutánea. Estos animales tienen integrado un transgén con el gen v-Ha-*ras* bajo el promotor de la ζ -globina que se expresa de forma ectópica en piel en situaciones de hiperproliferación (como roces o heridas), dando lugar a la aparición de tumores epidérmicos espontáneos. Se ha aprovechado esta propiedad

para realizar experimentos de carcinogénesis química por aplicación tópica con el agente promotor TPA, evitando el paso de iniciación con un carcinógeno como el DMBA (Leder y cols., 1990; Spalding y cols., 1993). De este modo, estos animales desarrollan múltiples papilomas e incluso algunos llegan a malignizar.

1.3.1.2 Inyección subcutánea de células en ratones inmunodeficientes

Finalmente, los ensayos de carcinogénesis por inyección subcutánea de células son un buen modelo para conocer el potencial tumorigénico de diferentes líneas celulares. Asimismo, permiten estudiar posibles cambios en el grado de malignidad tumoral, como consecuencia de la expresión de un determinado transgén (Casanova y cols., 2002; Leis y cols., 2004). También es interesante destacar la aplicación de este tipo de ensayos para el estudio de la eficacia de determinados fármacos antitumorales (Galve-Roperh y cols., 2000; Casanova y cols., 2003).

1.3.2 El complejo IKK en la carcinogénesis epitelial

Diversos estudios han puesto de manifiesto la implicación tanto de IKK α como IKK β en la tumorigénesis epitelial. Respecto a IKK α , no está claro el papel que desempeña en el desarrollo tumoral, ya que se han publicado resultados contradictorios: mientras que unos estudios aseguran que IKK α actúa como supresor tumoral, a partir de otros se concluye que IKK α tiene un papel importante como promotor tumoral (Liu y cols., 2006; Maeda y cols., 2007). Así, analizando SCCs epidérmicos humanos, se ha publicado que mientras que los tumores más diferenciados expresan IKK α , esta expresión se pierde a medida que el tumor es más indiferenciado. Asimismo, ratones transgénicos que sobreexpresan IKK α bajo la dirección del promotor de loricrina en las capas suprabasales de la epidermis muestran menor número de tumores, y con menor capacidad de metastatizar, cuando se les somete a experimentos de carcinogénesis química de piel (Liu y cols., 2006). Estos datos indicarían que IKK α actúa como supresor tumoral. Sin embargo, otros autores han publicado que IKK α regula negativamente la diferenciación terminal de células epiteliales provenientes de SCCs orales, lo que incrementaría la malignidad de los tumores (Nakayama y cols., 2005). Además, recientemente se ha demostrado que IKK α está implicada en la promoción de metástasis, a través de la señalización mediada por RANK y RANK ligando, en un modelo de cáncer de próstata; en este modelo la fosforilación de IKK α induce la represión del promotor de *maspin* (gen que codifica para una proteína supresora de metástasis) en células epiteliales malignas, lo cual promueve el proceso metastático de estas células (Luo y cols., 2007).

IKK β está también implicado en el desarrollo de ciertos tipos de cáncer (Karin, 2006b). En algunos tumores primarios de glándula mamaria de pacientes humanos, la regulación negativa de FOXO3A por IKK β es un mecanismo fundamental en la promoción de tumorigénesis (Hu y cols., 2004). IKK β es además importante para el desarrollo de cáncer de colon en modelos animales por dos mecanismos diferentes: bien por inhibición de la apoptosis en las células epiteliales, bien por causar el crecimiento del tumor como consecuencia de los factores de crecimiento y citoquinas producidos a partir de las células inflamatorias (Greten y cols., 2004). Por último, ratones transgénicos (obtenidos en nuestro laboratorio) que expresan IKK β en epitelios estratificados muestran hiperplasia en piel y la aparición de tumores espontáneos en epitelios estratificados internos. Todos estos resultados destacan la importancia de IKK β en el desarrollo de ciertos tipos de tumores y presentan a esta proteína como una posible diana terapéutica en terapias antitumorales.

1.3.3 CYLD en la carcinogénesis epidérmica

Como se ha comentado anteriormente, se sabe que en humanos mutaciones en el gen *CYLD* causan la enfermedad cilindromatosis hereditaria, que cursa con la aparición de múltiples tumores, la mayor parte de las veces benignos (Bignell y cols., 2000), debido a una activación permanente de NF- κ B y a una mayor resistencia a la muerte celular por apoptosis (Brummelkamp y cols., 2003). El análisis de ratones deficientes en *CYLD* (*Cyld*^{-/-}) ha demostrado que éstos son más propensos al desarrollo de tumores de piel tras ser sometidos a un protocolo de carcinogénesis química (DMBA/TPA) debido a un incremento en la proliferación de las células tumorales (Massoumi y cols., 2006). Se ha sugerido que en ausencia de *CYLD*, la señalización persistente de NF- κ B contribuiría al crecimiento celular aberrante y a la aparición de tumores, promovidos por una inhibición de muerte celular por apoptosis, o al mismo tiempo, por un incremento en la proliferación celular debido al aumento en la actividad nuclear de p50 y p52 (Courtois y Gilmore, 2006).

Recientemente se ha relacionado al gen *CYLD* con otros tipos de cáncer no cutáneo. Así, se ha visto que aunque los ratones *Cyld*^{-/-} no presentan alteraciones fenotípicas, son más susceptibles a la aparición de inflamación intestinal y al desarrollo de cáncer de colon en un modelo de cáncer asociado a colitis (CAC). Todo ello aporta nuevos datos que apoyan la idea de que *CYLD* actúa como supresor tumoral (Zhang y cols., 2006).

1.3.4 El factor de transcripción NF- κ B en la carcinogénesis epidérmica

En cuanto al factor de transcripción NF- κ B, es considerado tanto promotor como supresor tumoral, dependiendo del contexto y del sistema experimental (Perkins, 2004). Mientras que en el sistema inmune y en otros órganos y tejidos la activación de NF- κ B protege contra la apoptosis, promueve proliferación celular, angiogénesis y la expresión de genes asociados con crecimiento y supervivencia tumoral (Barkett y Gilmore, 1999; Karin y cols., 2002), en la piel las proteínas NF- κ B se oponen a la proliferación. Así, la inhibición de NF- κ B por expresión de su inhibidor I κ B en la epidermis de ratones transgénicos causa la aparición de hiperplasia epitelial (Seitz y cols., 1998) e incluso el desarrollo de carcinomas escamosos e inflamación mediada por TNF- α (van Hogerlinden y cols., 1999) y el bloqueo de NF- κ B coopera con Ras para producir tumores cutáneos invasivos (Dajee y cols., 2003). Aunque otros trabajos, por el contrario, indican que NF- κ B podría favorecer la tumorigénesis epitelial, ya que la actividad de NF- κ B se incrementa con la progresión tumoral (Budunova y cols., 1999).

1.4 Silenciamiento génico por interferencia de ARN

La interferencia de ARN (RNAi) es un fenómeno producido a partir de pequeñas moléculas de ARN conocidas como siRNAs (del inglés *short interfering RNAs*), que permiten la inhibición de la expresión génica de forma eficiente y específica. Fue descrito formalmente por los Drs. Fire, Mello y cols. en 1998 como una respuesta biológica frente a la inyección de moléculas de ARN de doble cadena (dsRNAs, del inglés *double-stranded RNAs*) en *Caenorhabditis elegans*, que provocaba el silenciamiento de aquellos genes que contenían la secuencia complementaria a la de los ARNs inyectados (Fire y cols., 1998). Actualmente se conoce que la interferencia de ARN es un mecanismo presente en la mayor parte de los eucariotas (Hannon, 2002). En un principio, la función reconocida para este mecanismo fue la de proteger a los organismos frente a los virus ARN (Waterhouse y cols., 2001), o la de prevenir la integración de elementos transponibles en el genoma. Sin embargo, a raíz del descubrimiento de genes que codifican específicamente para ARNs de pequeño tamaño (denominados micro-ARNs, miRNAs) con actividad reguladora en plantas y animales (Bartel, 2004), se sabe que una de las funciones principales de la interferencia de ARN es la de regulación de la expresión génica.

El mecanismo de silenciamiento génico se inicia mediante el procesamiento de moléculas de dsRNA de cadena larga por el enzima Dicer –endonucleasa del tipo RNasa III– en el citoplasma para dar lugar a moléculas pequeñas de ARN (siRNAs) de

aproximadamente 22 nucleótidos de longitud (Bernstein y cols., 2001). Estos siRNAs son fosforilados en los extremos 5' e incorporados a un complejo multiproteico denominado RISC (del inglés *RNA-inducing silencing complex*) (Nykanen y cols., 2001). A continuación la doble cadena del siRNA es escindida, presumiblemente por una helicasa, quedando únicamente unida al complejo RISC la cadena antisentido, que actúa como guía para el reconocimiento del ARN mensajero diana. Finalmente, la unión del complejo RISC produce el silenciamiento génico mediante un corte en la región de complementariedad del ARN mensajero que conduce a su posterior degradación (figura 8-A) (Meister y Tuschl, 2004).

La inhibición de la expresión de genes específicos por interferencia de ARN se ha convertido en una herramienta muy útil para el estudio de la función génica en muchos organismos. En mamíferos existe una dificultad debido a que la presencia de ARNs de doble cadena desencadena una respuesta inmune innata no específica regulada por interferón, donde se activa la proteína quinasa PKR, produciendo una inhibición global de la traducción de ARN mensajeros como mecanismo de respuesta antiviral (Williams, 1997). Esta limitación hizo prever una incompatibilidad con el uso del silenciamiento génico por RNAi en mamíferos. Sin embargo, los componentes implicados en el silenciamiento están conservados en mamíferos (Bernstein y cols., 2001), y se confirmó que las moléculas de ARN de doble cadena pueden inducir una respuesta específica al ser introducidos en sistemas donde la respuesta antiviral inespecífica no es prevalente, como son los embriones o las líneas celulares embrionarias de mamífero (Hannon, 2002). Finalmente, Tuschl y cols. demostraron que la introducción de ARNs de pequeño tamaño (menores de 30 nucleótidos de longitud) permiten el silenciamiento génico evitando la respuesta antiviral inespecífica (Elbashir y cols., 2001). El diseño de los siRNAs específicos para el gen de interés es un paso fundamental, determinante de la eficiencia final del silenciamiento génico. Se han propuesto varias pautas para el diseño de estos siRNAs, utilizando algoritmos basados en parámetros termodinámicos y considerando diferentes factores intrínsecos tanto del ARN mensajero como del siRNA (Dykxhoorn y cols., 2003; Hannon y Rossi, 2004), que ofrecen información útil en la búsqueda de la secuencia más adecuada para interferir el gen de interés. En el caso del ARN interferente, uno de los factores limitantes del proceso es la estructura del siRNA que determina la estabilidad en la unión de la cadena antisentido al complejo RISC (Hannon y Rossi, 2004).

La introducción de siRNAs en células de mamíferos puede realizarse de múltiples formas. La transfección directa resulta muy útil para el silenciamiento específico de la expresión génica (Hannon y Rossi, 2004), aunque actúa de forma transitoria ya que no existen mecanismos de propagación y amplificación de la interferencia de ARN en

células de mamíferos. Para lograr una mayor duración en la inhibición del gen de interés, se han desarrollado vectores que expresan siRNAs dirigidos por promotores de la ARN Polimerasa III, como U6 y H1 (Dykxhoorn y cols., 2003). Entre estos vectores, destacan aquellos que expresan siRNAs con una estructura tipo horquilla, denominados shRNAs (*short hairpin RNAs*), que mimetizan la estructura de los micro-ARNs y son procesados por el enzima Dicer en siRNAs (figura 8-B) (Brummelkamp y cols., 2002; Tuschl, 2002). El desarrollo de estos vectores ha hecho posible la generación de modelos transgénicos de silenciamiento de la expresión génica a modo de alternativa complementaria a otros estudios de pérdida de función génica, como la tecnología de inactivación génica por recombinación homóloga en células ES. Entre las aproximaciones empleadas en la generación de estos modelos se encuentran la microinyección pronuclear (Hasuwa y cols., 2002), transfección en células ES (Carmell y cols., 2003; Kunath y cols., 2003), infección de embriones o células ES con vectores lentivirales recombinantes (Lois y cols., 2002; Robinson y cols., 2003; Tiscornia y cols., 2003) e incluso la inserción de una construcción (*knock in*) en un *locus* determinado del genoma del ratón (Seibler y cols., 2005). Además, recientemente se han diseñado otros vectores que permiten la expresión del transgén en un tejido determinado o mediante sistemas inducibles y dirigidos por promotores de la ARN Polimerasa II y III (Shinagawa y Ishii, 2003; Ventura y cols., 2004; Zhou y cols., 2005), con lo que es posible inhibir de forma específica de tejido, al menos teóricamente, la expresión del gen de interés. Sin embargo, pese al potencial que presenta esta tecnología, son muy pocos los trabajos publicados en los que analizan con detalle la aplicabilidad y eficacia de estas aproximaciones para inhibir la expresión de una proteína concreta en modelos animales.

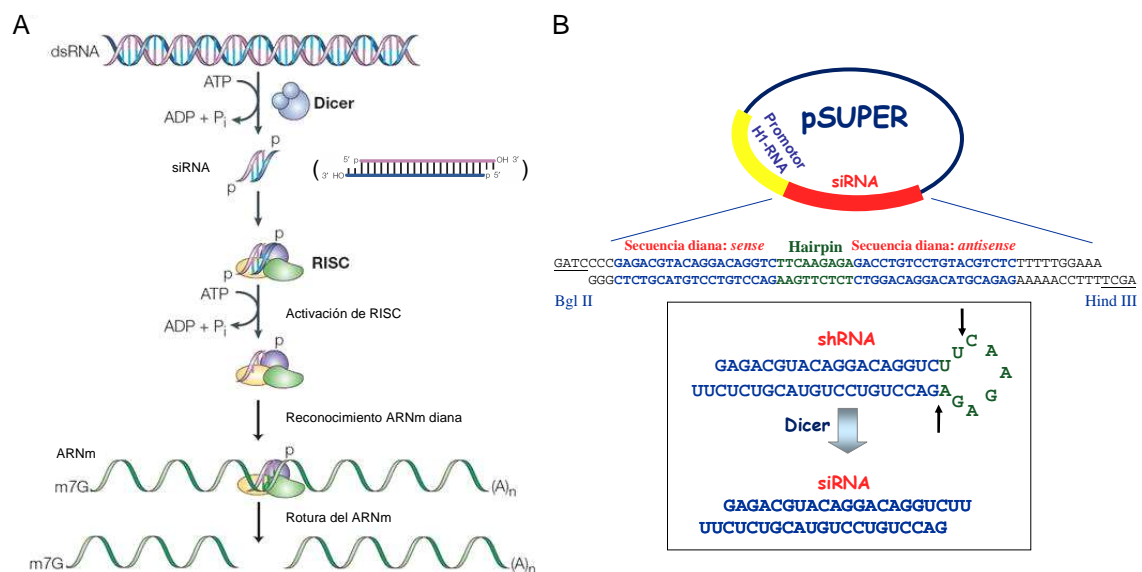


Figura 8. Representación esquemática del proceso de interferencia de ARN, así como de un sistema de expresión de siRNAs comúnmente usado en células de mamíferos. (A) Mecanismo de silenciamiento génico por rotura del ARNm diana en el que participan el enzima Dicer y el complejo RISC. Adaptado de Dykxhoorn, 2003. (B) Vector de expresión que dirige la síntesis de siRNAs tipo horquilla, mediante el promotor H1, y su posterior procesamiento por el enzima Dicer.

2 OBJETIVOS

Las alteraciones en el control de la proliferación y diferenciación epidérmica llevan a diversas patologías, y entre ellas la aparición de tumores, siendo el cáncer de piel el tumor más frecuente en occidente. El complejo IKK y la vía de señalización de NF- κ B desempeñan un papel central en el mantenimiento del equilibrio entre la proliferación y la diferenciación de la piel. Además, la subunidad IKK α del complejo IKK y el gen supresor tumoral cutáneo *CYLD* (regulador negativo de la vía de NF- κ B) se han relacionado con la formación de tumores epiteliales.

En esta memoria nos planteamos llegar a tener un conocimiento más profundo de los mecanismos moleculares implicados en la diferenciación de los queratinocitos, lo que servirá de base para comprender los mecanismos que controlan la diferenciación de los tumores de piel y la génesis de las distintas variantes histológicas tumorales.

Para ello, emplearemos diversas líneas celulares epidérmicas manipuladas genéticamente, ratones transgénicos con sobreexpresión o disminución de la expresión de proteínas reguladoras de esta vía, cultivos de equivalentes de piel humana, análisis de tumores humanos y ensayos de *microarrays*.

Teniendo en cuenta estos antecedentes, nos hemos propuesto los siguientes objetivos para el trabajo de investigación que se describe en esta memoria:

1. Estudio de la función de la subunidad IKK α en la diferenciación de los queratinocitos y en la progresión de tumores de piel:
 - 1.1. Consecuencias bioquímicas y funcionales del incremento en los niveles de expresión de IKK α en queratinocitos.
 - 1.2. Consecuencias del incremento en los niveles de expresión de IKK α sobre el desarrollo tumoral en líneas celulares y ratones transgénicos. Implicación de IKK α en otras patologías humanas no tumorales.
2. Aplicación de la tecnología de interferencia de ARN en organismos completos (ratones transgénicos): uso de esta tecnología para inhibir la expresión de IKK α .
3. Estudio de la relevancia de las mutaciones en *CYLD* en queratinocitos tumorales: análisis de líneas celulares epidérmicas y de SCCs.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Plásmidos utilizados y subclonajes

pSUPER: Vector de expresión diseñado para dirigir la síntesis de siRNAs en células a través del promotor de expresión ubicua H1 (OligoEngine; Brummelkamp y cols. 2002).

pBSK-K5: Vector de expresión que contiene 5.2 Kpb de secuencias 5' del promotor de la queratina 5 bovina (Ramirez y cols., 1994) seguidas de 0.5 Kpb de un intrón de la β -globina de conejo y señales de poliadenilación de SV40 (Woodroffe y cols., 1992), clonados en pBSK.

pRC- β Actin-3xHA-IKK α : Vector de expresión que contiene tres copias de un péptido procedente de la proteína hemaglutinina del virus influenza humana (epítipo HA) y la secuencia del ADNc del gen *Ikk α* de ratón, clonados bajo el promotor de la β -actina; este plásmido confiere resistencia a geneticina.

pcDNA3-CYLD-mut-hygro: Vector de expresión que contiene las secuencias del epítipo HA y el ADNc del gen *CYLD* humano, proporcionada por el Dr. Bernards (NKI, Amsterdam, Holanda), con una mutación en el aminoácido 601 (Cys \rightarrow Ser), clonado en pcDNA3. Esta mutación provoca que la proteína actúe como un dominante negativo (Brummelkamp y cols., 2003).

pBZ: Plásmido que contiene el promotor de la β -actina humana. Este plásmido confiere resistencia a geneticina (Frederickson y cols., 1989).

pcDNA3: Vector de expresión que contiene una secuencia mínima del promotor del citomegalovirus (CMV) y que confiere resistencia a geneticina (Invitrogen Life Technologies).

β -actin-CYLD-mut: Plásmido que contiene el ADNc de la forma dominante-negativa del gen *CYLD* humano (referida en esta tesis como *CYLD*-mutante o *CYLD*-mut), clonado bajo el promotor de la β -actina. Este plásmido confiere resistencia a geneticina. El plásmido pcDNA3-CYLD-mut-hygro se digirió con los enzimas NotI / HindIII para aislar el fragmento que contenía el ADNc del gen *CYLD*-mut junto al epítipo HA y se insertó en el vector pRC- β Actin-3xHA-IKK α , previamente digerido con los enzimas NotI / HindIII (con lo que se suprime el fragmento que contiene el ADNc del gen *Ikk α* clonado anteriormente en este mismo vector).

SUPER-1, SUPER-2 y SUPER-Control: Plásmidos que contienen una secuencia para la expresión de siRNAs específicos del gen *Ikkα* de ratón (SUPER-1 y SUPER-2) o de un siRNA no específico (SUPER-Control), clonados en todos los casos en el vector de expresión pSUPER. Se diseñaron oligonucleótidos específicos de *Ikkα* -GeneBank NM_007700- y su respectivo control, con un tamaño de 64 nucleótidos. Las secuencias constan de una región de 19 nucleótidos específica del gen de interés, seguido de otra región de 19 nucleótidos complementaria a la anterior pero en sentido contrario y separadas ambas por un espaciador. Además, se incluyen en los extremos de los oligonucleótidos dianas de corte para los enzimas de restricción BglII en 5' y HindIII en 3' para clonarlo en pSUPER (figura 9).

Para seleccionar las secuencias diana del ARN mensajero de *Ikkα* y diseñar los siRNAs, se utilizaron los programas informáticos en red proporcionados por Oligoengine (<http://www.oligoengine.com/>) y Clontech (<http://www.clontech.com/>). De todos los posibles candidatos escogimos dos siRNAs con secuencias complementarias al ARN mensajero de *Ikkα* (siRNA-IKKα1 y siRNA-IKKα2) y uno control, con contenido de bases equivalente, pero sin homología con ninguna secuencia conocida del genoma del ratón (siRNA-Control). Las secuencias elegidas se muestran en la figura 9, y se indican las zonas de complementariedad con el ARN mensajero de *Ikkα*. Las construcciones finales se denominaron SUPER-1, SUPER-2 y SUPER-Control, respectivamente.

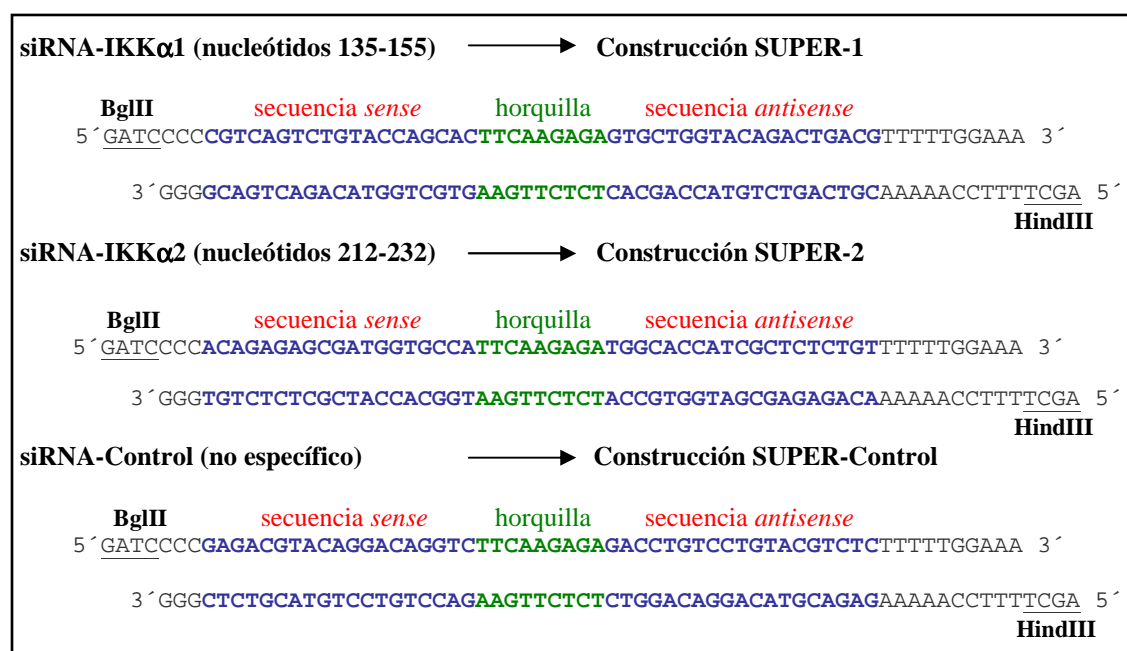


Figura 9. Secuencia de los siRNAs específicos para el gen *Ikkα* de ratón y control utilizados en los experimentos de interferencia.

K5-IKK α : Plásmido que contiene el ADNc del gen *Ikk α* de ratón, clonado en el vector de expresión pBSK-K5 y bajo el promotor de la queratina 5 bovina. El plásmido pRC- β Actin-3xHA-IKK α se digirió con los enzimas NotI / HindIII y se aisló el fragmento de 2.3 Kpb que contenía el ADNc del gen *Ikk α* de ratón, precedido en 5' por el epítipo HA. Los extremos de este fragmento se rellenaron con la subunidad Klenow de la ADN-Polimerasa I y se insertó en el vector pBSK-K5, previamente digerido con SnaBI y desfosforilado.

3.2 Cultivos celulares

3.2.1 Medios de cultivo

El medio utilizado fue *Dulbecco's modified Eagle's* (DMEM, Gibco-BRL, Life Technologies), con antibiótico 1x (Gibco) y suplementado con un 10% de suero fetal bovino (FBS). Las células que fueron transfectadas de forma estable con plásmidos que conferían resistencia a geneticina (véase más abajo) se seleccionaron con 0.45 mg/ml de geneticina (G418, Calbiochem) en el medio.

El medio utilizado para los equivalentes de piel fue DMEM y HAM'S F12 (Gibco-BRL) (1:3), suplementado con un 10% de FBS, insulina (5 μ g/ml, Sigma), toxina colérica (8 ng/ml, Sigma), hidrocortisona (0,4 μ g/ml, Sigma), EGF (10 ng/ml, Sigma) y tirosina triyodada (1,3 ng/ml, Sigma). Los medios fueron filtrados con filtros de 0.22 μ m (Millipore Corporation).

3.2.2 Condiciones de cultivo

Los cultivos celulares se mantuvieron a 37° C en una atmósfera saturada de humedad compuesta por un 95% de aire y un 5% CO₂ (en un incubador NAPCO). El medio de cultivo se cambió habitualmente cada dos o tres días en función de la actividad metabólica celular. Todas las manipulaciones se realizaron en condiciones estériles, en cabina de flujo laminar vertical.

Para proceder al subcultivo celular, la capa de células se lavó con PBS y las células se liberaron de la superficie de crecimiento mediante una solución Tripsina/EDTA (0.25% en PBS, Trypsin 1-300, ICN Biomedicals). Para su preservación, las células se congelaron en nitrógeno líquido en un medio de congelación con DMSO al 10% como agente crioprotector.

3.2.3 Líneas celulares

HaCaT: línea celular inmortalizada espontáneamente a partir de un cultivo primario de queratinocitos humanos (Boukamp y cols., 1988), obtenida en el pase 35.

HEK-293T: Línea celular epitelial transformada derivada a partir de células humanas embrionarias de riñón (Graham y cols., 1977).

PDVC57: Línea tumorigénica de queratinocitos murinos procedentes de la línea celular PDV transformada con DMBA *in vitro* (Quintanilla y cols., 1991).

PB: Línea de queratinocitos murinos inmortalizados, que proviene de un papiloma de piel de ratón (Yuspa y cols., 1986).

MCA3D: Línea celular no tumoral obtenida a partir de queratinocitos murinos tratados con DMBA (Kulesz-Martin y cols., 1983).

HaCa-4: Línea celular tumoral derivada de SCCs iniciados por el retrovirus HaMSV y promovidos con TPA (Brown y cols., 1986).

3.3 Transfecciones celulares

La transfección de plásmidos recombinantes se realizó en monocapas de células en fase exponencial de crecimiento y en placas p100 mediante precipitados de ADN con fosfato cálcico. Se mezclaron 20 µg de ADN plasmídico (para la transfección de células HaCaT, PB y PDVC57) ó 7 µg (para células 293T), en 500 µl de Tris/EDTA (TE) 0.2x con 62.5 µl de CaCl₂ 2 M. La mezcla se añadió sobre 500 µl HBS gota a gota y en agitación. Se dejó 20 min a temperatura ambiente para favorecer la formación de precipitados y se añadió finalmente sobre las células en cultivo gota a gota por toda la placa.

3.3.1 Transfecciones estables

Para la generación de transfectantes estables se cultivaron las células en presencia de 0,45 mg/ml de geneticina (G418) durante dos semanas. Al cabo de este tiempo se crecieron en forma de grupos de clones en los que se mezclaban todas las colonias resistentes (de 2 a 100). A continuación, se procedió a la congelación o expansión de cada uno de ellos.

Línea celular HaCaT: Las células se transfectaron de manera estable e independientemente con los plásmidos pRC- β Actin-3xHA-IKK α (denominada H-IKK α), β -actin-CYLD-mut (H-CYLD-mut) y los controles pBZ y pcDNA3 (H-Control). En el caso de H-IKK α , se obtuvieron tres poblaciones diferentes denominadas H-IKK α -Pool (compuesta por la mezcla de más de 60 colonias diferentes), H-IKK α -2c (compuesta por 2 colonias resistentes a geneticina) y H-IKK α -3c (compuesta por 3 colonias).

Línea celular PDVC57: Las células se transfectaron de manera estable e independientemente con los plásmidos pRC- β Actin-3xHA-IKK α (C57-IKK α), β -actin-CYLD-mut (C57-CYLD-mut) y pcDNA3 (C57-Control). Estos transfectantes proceden de la mezcla de 40-50 colonias diferentes.

Línea celular PB: Las células se transfectaron de manera estable e independientemente con los plásmidos β -actin-CYLD-mut (PB-CYLD-mut) y pBZ (PB-control). Estos transfectantes proceden de la mezcla de 80-100 colonias y para CYLD-mut se obtuvieron 3 poblaciones diferentes (CYLD-mut1, 2 y 3).

3.3.2 Transfecciones transitorias

Las células HEK-293T se cotransfectaron transitoriamente con pRC- β Actin-3xHA-IKK α junto con SUPER-1, SUPER-2, SUPER-Control o pSUPER-vacío en cada caso. Se incubaron durante 24-48 h para alcanzar su máxima expresión antes de proceder al lisado celular para su análisis.

3.4 Diferenciación de las células HaCaT

Las células HaCaT son capaces de diferenciar *in vitro* de manera similar a la diferenciación natural de la epidermis, formando varios estratos celulares con expresión secuencial de los marcadores de diferenciación ya mencionados en la introducción de esta memoria. La inducción del proceso de diferenciación en las células HaCaT se llevó a cabo en condiciones de semi-confluencia celular y ausencia de suero (Ryle y cols., 1989; Paramio y cols., 2000). Se pusieron a diferenciar varias placas de células transfectadas con cada construcción y se recogieron los lisados celulares a distintos días de diferenciación (entre 0 y 20 días) para su posterior análisis.

3.4.1 Obtención de corneocitos

Como estimación de la diferenciación terminal de los queratinocitos se analizó la presencia de corneocitos producidos en el cultivo celular en condiciones de diferenciación. El aislamiento de los corneocitos se realizó tal y como se describe en Jarnik y cols., 2002. Brevemente, los sobrenadantes celulares se centrifugaron y la fracción sedimentada se hirvió en un medio con SDS 2%, 20 mM DTT, 0.1 M Tris-HCl pH 8.0 y 0.5 mM EDTA. Posteriormente se recogieron los sobrenadantes resultantes y se observaron al microscopio óptico. La cuantificación se realizó mediante el conteo del número total de corneocitos en cámara de Neubauer.

3.4.2 Preparación de geles de fibrina para los cultivos de equivalentes de piel

El fibrinógeno procedente del crioprecipitado del plasma de la sangre de cerdo se utilizó como fuente de fibrina. El plasma fue proporcionado por la Unidad de Medicina y Cirugía Experimental del Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid). El plasma fue congelado a -80° C durante al menos 2 h y descongelado a 4° C para obtener el crioprecipitado. El crioprecipitado se recogió en tubos Falcon de 50 mL y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min a 4° C. El sobrenadante fue retirado y el sedimento se resuspendió en 10 mL de NaCl 0,9%.

El gel de fibrina se preparó con 4 ml de medio DMEM (FBS 10%) al que se añadieron 3×10^4 fibroblastos neonatales humanos, 9 unidades de trombina bovina (Sigma) diluida en 0.5 ml de Cl_2Ca 25 mM y 2,5 ml de la solución de fibrinógeno (crioprecipitado). La mezcla se sembró en placas *transwell* que contienen una membrana de polietileno tereftalato (PET) en su base (tamaño de poro 0.1 μm ; Becton Dickinson Labware), que colocamos sobre placas de 35 mm y se dejó solidificar durante 45 min a 37° C. Los queratinocitos se sembraron sobre el gel de fibrina y fueron cultivados en el medio de cultivo para equivalentes de piel (ver apartado 3.2.1) hasta su confluencia, tal y como se describe en Del Río y cols., 2002. Para inducir la diferenciación celular en estos cultivos, se retiró el medio sobrenadante de forma que los queratinocitos pudiesen crecer y diferenciar en la interfase medio-aire. Los equivalentes de piel se recogieron a distintos tiempos (0, 2, 6, 10 ó 13 días tras la retirada del medio sobrenadante) y se estudió su organización histológica mediante tinciones con hematoxilina-eosina. Se sometieron a técnicas inmunohistoquímicas para la detección de diferentes proteínas.

3.5 Actividad metaloproteinasa

Se recogió el medio de cultivo de 3 días de los equivalentes de piel de queratinocitos HaCaT en los días 15 y 20 de diferenciación y se midió la concentración de proteínas mediante el análisis colorimétrico de Bradford (BioRad). El sobrenadante se guardó a -80° C hasta su utilización. Los zimogramas se realizaron según el método descrito por Heussen y Dowdle, 1980. Se tomaron 20 µg de extractos proteicos procedentes de los diferentes medios obtenidos y se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 10%, conteniendo gelatina 0.1% (p/v) (Sigma) y en presencia de SDS 0.1% (p/v). Las muestras no se desnaturalizaron térmicamente y la electroforesis se realizó en condiciones no reductoras. Tras el desarrollo electroforético a 4° C, los geles se lavaron dos veces, durante 30 min, con tampón Tris 50 mM pH 7.4, conteniendo Tritón X-100 2.5% (p/v). Posteriormente, se realizaron dos lavados sucesivos de 10 min cada uno con tampón Tris 50 mM pH 7.4 y después el gel se incubó durante 24-72 h a temperatura ambiente en un tampón en el que la actividad gelatinasa es máxima (Tris 50 mM pH7.5, NaCl 0.15 M, CaCl₂ 10 mM, Tritón X-100 0.1%, NaN₃ 0.02%).

Los geles se tiñeron con una solución de azul de Coomassie R-250 0.25% en metanol:ácido acético:agua (5:1:5) durante 3 h a temperatura ambiente. El destañido del gel se realizó por repetidas inmersiones en ácido acético 7.5%. La tinción negativa, debido a la eliminación de la gelatina presente en el gel, desveló la presencia de proteínas con actividad gelatinolítica.

3.6 Ensayo de bloqueo de cadherina-E

Las células se plaquearon en placas *multiwell* de 24 pocillos y se crecieron hasta alcanzar un 80% de confluencia. Seguidamente se pusieron en condiciones de diferenciación en presencia en el medio de cultivo de 0, 5, 10 ó 20 µg/ml de un anticuerpo anti-cadherina-E humano bloqueante (S-17, antisuero de cabra –IgG– que reconoce una región del dominio extracelular de cadherina-E humana; Santa Cruz Biotechnology), o de una concentración equivalente de un anticuerpo IgG no específico de cabra, que se usó como control (IgG control) (AbD Serotec). La incubación con los anticuerpos se mantuvo durante 7 días, con reposición de los mismos cada 24 h.

3.7 Ensayos de proliferación y clonogenicidad

Estudiamos la proliferación celular mediante la realización de curvas de crecimiento, el análisis del porcentaje de células en fase de síntesis de ADN por incorporación de BrdU y mediante ensayos de formación de colonias. Para las curvas de crecimiento, se pusieron en cultivo 12 placas p100 con 10^5 células para cada una de las construcciones, se tripsinizaron tres placas en cada tiempo (24 h, 48 h, 72 h y 96 h) y se contó el número de células de cada una de ellas en cámara de Neubauer. Para el análisis de incorporación de BrdU, se pusieron en cultivo 3×10^4 células en placas *multiwell* de 6 pocillos sobre cubres de plástico y a las 48 h se incubaron con BrdU 10 μ M diluido en el medio durante 1 h. A continuación, las células se fijaron en formol 15 min. El procesamiento inmunohistoquímico para detectar las células positivas se realizó tal y como se describe en el apartado 3.18. Para el ensayo de formación de colonias se sembraron, por triplicado, 500 células de las distintas poblaciones y se esperaron 11 ó 21 días antes de teñir las células, PDVC57 y HaCaT respectivamente, con cristal violeta. Se contó el número de colonias de más de 0.5 mm de diámetro por placa y se midió el tamaño de las mismas.

3.8 Ensayo de crecimiento en suspensión

Se incubaron placas *multiwell* de 6 pocillos con 700 μ l de agarosa al 0.9%, en medio DMEM sin suero. A continuación, se añadieron 3×10^5 células en 1.5 ml de medio DMEM sin suero. A las 24 h se recogieron alícuotas de 600 μ l y se incubaron en placas *multiwell* de 24 pocillos en medio DMEM suplementado con un 10% de FBS. A las 24 h siguientes, se fijaron las células en etanol 70% durante 15 min y seguidamente se tiñeron con cristal violeta para su posterior contaje. Se repitió el experimento 3 veces y por duplicado.

3.9 Detección de VEGF en el medio de cultivo de queratinocitos

Se recogieron y filtraron (0.22 μ m) los medios sobrenadantes de los queratinocitos de ratón cultivados durante tres días y se midió la concentración de VEGF secretado por ELISA mediante un kit comercial específico para la proteína VEGF de ratón, siguiendo las instrucciones del fabricante (R&D Systems). Todos los medios sobrenadantes fueron filtrados (filtros *Millex* 0.22 μ m, Millipore Corporation) y guardados a -80° C hasta su utilización.

3.10 Cinética de degradación de I κ B α

Las células se incubaron en condiciones de bajo suero (FBS 0.1%) durante 6 h antes del tratamiento con TNF- α (50 ng/ml) en los tiempos indicados. A continuación, fueron lisadas para la obtención de los extractos proteicos y se analizó la degradación de I κ B α mediante *Western blot* (apartado 3.19) utilizando un anticuerpo anti- I κ B α .

3.11 Ensayo de unión al ADN de NF- κ B

La actividad de unión al ADN de NF- κ B se realizó mediante un ensayo colorimétrico comercial para las subunidades p50 y/o p65 siguiendo las instrucciones del fabricante (Chemicon) y a partir de extractos proteicos nucleares o totales de células en cultivo. Las células fueron previamente incubadas, en los casos donde se indique, con TNF- α (50 ng/ml) durante 30 min.

3.12 Ensayos de apoptosis

A) Para el ensayo de apoptosis inducido por la estimulación con TNF- α , se pusieron en cultivo 2×10^5 células en placas *multiwell* de 6 pocillos y a las 24 h aproximadamente, se incubaron en presencia de TNF- α (10 ng/ml ó 50 ng/ml) y cicloheximida (CHX, 10 μ g/ml) durante 16 h para inducir muerte celular por apoptosis. Transcurrido ese tiempo se lavaron y tripsinizaron las placas y a continuación, se contó el número de células viables de cada una de ellas en cámara de Neubauer.

B) El análisis de células apoptóticas mediante TUNEL se realizó tanto en muestras de tumores fijadas en etanol al 70% como en células en cultivo fijadas en formaldehído al 4% mediante técnicas inmunofluorescentes utilizando el kit *In situ Cell Death Detection, Fluorescein* (Roche), siguiendo las instrucciones del fabricante. El ensayo se basa en la detección del nucleótido dUTP añadido por el enzima TdT en los extremos 3' de los fragmentos de ADN característicos de células en proceso de apoptosis. En el caso de los tumores, se hizo una doble inmunofluorescencia con el anticuerpo anti-K5. Tras la incubación se detectaron las células marcadas en un microscopio de fluorescencia.

3.13 Animales de experimentación

Los animales fueron criados en el servicio de animalario del CIEMAT (Centro Usuario de Animales de Experimentación 28079-21A) bajo condiciones estándar (aire filtrado HEPA, humedad relativa de $55 \pm 15\%$, temperatura $20 \pm 2^\circ \text{C}$, ciclos de luz/oscuridad de 12 h, alimentación *ad libitum* y agua de bebida irradiada y clorada). De igual forma, se controló de manera rutinaria la presencia de patógenos de acuerdo con los procedimientos recomendados por FELASA (*Federation of European Laboratory Animal Science Associations*). Todos los procesos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con la regulación española (R.D. 1201/2005 para la protección y uso de animales en investigación científica) y la Convención Europea ETS-123 sobre el uso y protección de mamíferos utilizados para experimentación y otros propósitos científicos. Los procedimientos fueron aprobados por el Comité Ético de Experimentación Animal del CIEMAT, de acuerdo a las normas externas e internas de bioseguridad y bioética

3.13.1 Cepas de ratón empleadas

B6D2F1: Animales híbridos de la primera generación (F1) procedentes de cruces ♀ C57BL/6J x ♂ DBA/2J, criados en el animalario del CIEMAT. Todas las líneas transgénicas generadas para los experimentos en este trabajo se mantuvieron mediante cruces con animales de este fondo genético.

Hsd: athymic nude-Foxn1^{nu}: Animales inmunodeficientes (carentes de linfocitos T pero no B) suministrados por HARLAN.

Tg.AC: Animales que contienen un transgén con el gen v-Ha-ras bajo el promotor de la ζ -globina (Leder y cols., 1990), suministrados por Taconic. Su nombre comercial es: FVB/NTac-Tg (Hba-x-v-Ha-ras) Tg.ACLeD.

3.14 Generación de animales transgénicos

3.14.1 Construcción K5-IKK α

Se liberó el fragmento de ADN a microinyectar mediante digestión con Asp718. La banda correspondiente al transgén (figura 10) se aisló a partir de un gel de agarosa y se purificó usando una columna Elutip (Schleicher y Schüell, Alemania). El ADN se eluyó en tampón de microinyección (Tris 10 mM, pH 7.4; EDTA 0.1 mM) y se ajustó a una concentración final de 2 ng/ μL .

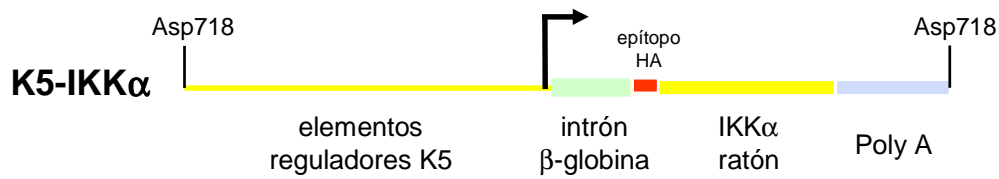


Figura 10. Esquema de la construcción génica K5-IKK α .

3.14.2 Construcción SUPER-1

Se aislaron dos fragmentos de diferente tamaño para microinyectar (A y B; figura 11), a partir de la construcción SUPER-1. La digestión EcoRI/ HindIII libera el fragmento A de 300pb, mientras que la digestión con EcoRI lineariza el plásmido, originando el fragmento B de 3Kpb. Las bandas correspondientes a los fragmentos A y B se aislaron, purificaron y eluyeron mediante el mismo procedimiento usado con la construcción K5-IKK α .

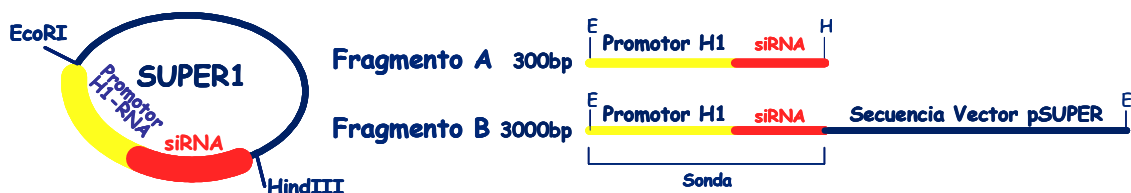


Figura 11. Esquema de la construcción SUPER-1. Los fragmentos A y B fueron obtenidos por digestiones EcoRI/HindIII y EcoRI respectivamente.

3.14.3 Microinyección pronuclear

La microinyección de embriones se realizó tal y como se describe en Hogan y cols., 1994. Para la inducción de superovulación se hormonaron hembras B6D2F1 de 3 semanas de edad mediante inyección intraperitoneal de 5 UI de gonadotropina de suero de yegua preñada (Folligon, Intervet) a las 12:00 h, seguido de una segunda inyección 47 h más tarde de 5 UI de gonadotropina coriónica humana (Choluron, Intervet) y se cruzaron con machos fértiles B6D2F1. A la mañana siguiente se seleccionaron por la presencia de tapón vaginal las hembras que habían sido fecundadas, se aislaron los oviductos y se recogieron los oocitos fecundados en medio M2 (Sigma). A continuación se incubaron brevemente con hialuronidasa (100 μ g/ml, Sigma) para separarlos de las células del cúmulo oóforo y se mantuvieron a 37 °C hasta su microinyección.

La microinyección de ADN se llevó a cabo en un microscopio Nikon Diaphot provisto de óptica Nomarski o contraste de interferencia diferencial (DIC) y equipado con micromanipuladores para controlar el movimiento de las pipetas de sujeción e inyección. Los embriones que sobrevivieron a la microinyección se transfirieron al oviducto de hembras B6D2F1 pseudopreñadas de 0.5 días (cruzadas la noche anterior con machos vasectomizados) en grupos de entre 20 y 25 embriones por hembra pseudopreñada. Los animales nacidos tras este proceso se analizaron a los 10-12 días de edad, por PCR o *Southern blot*, para detectar la presencia del transgén. Los ratones transgénicos obtenidos se cruzaron a los dos meses de edad con ratones B6D2F1 para obtener las correspondientes líneas transgénicas.

3.15 Análisis genotípico de ratones transgénicos

Los animales portadores del transgén se identificaron mediante *Southern blot* y PCR. Se analizaron por *Southern blot* todos los animales nacidos de las transferencias de embriones, para detectar los fundadores y analizar la integridad del transgén. Para el análisis de los cruces de amplificación de líneas se utilizó rutinariamente la PCR.

El aislamiento de ADN genómico se llevó a cabo a partir de biopsias de cola (5 mm) de ratones de aproximadamente 10 días de vida. El tejido se digirió en 0.7 ml de solución de digestión conteniendo 50 mM Tris-HCl pH 8.0, 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1% SDS y 0.5 mg/ml proteinasa K durante 3 h a 55° C con agitación. Después de tratar con 60 µg/ml de RNAasa A+T1, 30 min a RT, se añadió 250 µl de NaCl saturado, se agitaron las muestras 10 min y se centrifugaron a 14000 rpm, 5 min. El sobrenadante se precipitó con 500 µl de isopropanol, el ADN se lavó y se resuspendió en 100 µl de tampón Tris-EDTA (TE) 1x.

Para la detección de ratones transgénicos K5-IKK α por técnicas de *Southern blot*, se digirieron aproximadamente 10-15 µg de ADN con EcoRI. En el caso de los ratones transgénicos SUPER-1 (procedentes de inyecciones con los fragmentos A y B respectivamente) la detección se hizo digiriendo con XbaI o PstI. A continuación, se separaron la bandas mediante electroforesis en geles de agarosa del 0.8%. Los geles se transfirieron a membranas de nailon Hybond-N+ (Amersham Pharmacia Biotech) y se hibridaron con una sonda marcada radiactivamente con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, utilizando el sistema de marcaje Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech). Las sondas utilizadas corresponden a un fragmento de ADN que contiene, en el caso de K5-IKK α las secuencias reguladoras de K5 y para SUPER-1 el fragmento A de 300 pb.

Para el genotipado de los animales por PCR se usó la siguiente mezcla de reacción:

ADN (diluido 10 veces)	1 µl
Tampón 10x (Invitrogen)	2 µl
dNTPs (2mM, Invitrogen)	2 µl
Oligonucleótidos (10µM)	1 µl
MgCl ₂ (50 mM, Invitrogen)	1 µl
Enzima Taq polimerasa (Invitrogen)	0,2 µl
H ₂ O destilada	11,8 µl

Para la detección de animales K5-IKKα por PCR, se usaron como cebadores oligonucleótidos correspondientes a la secuencia del intrón de la β-globina de conejo (5'-TTC AGG GTG TTG TTT AGA ATG G-3' y 5'-CAA TAA GAA TAT TTC CAC GCC A-3'), amplificando un fragmento de 450pb. El programa de reacción utilizado en el termociclador fue el siguiente:

5 minutos 94° C,	desnaturalización
30 segundos 94° C	} 30 ciclos de amplificación
30 segundos 58° C	
50 segundos 72° C	
5 minutos 72° C,	extensión final

Para la detección de animales SUPER-1 por PCR, se usaron como cebadores oligonucleótidos correspondientes a la región promotora H1 en el 5' y la región que contiene el siRNA en 3' (5'-GTC ATC AAC CCG CTC CAA GG-3' y 5'-GAC TGA CGG GGG ATC TGT GG-3'), amplificando un fragmento de 228pb. El programa de reacción utilizado en el termociclador fue el siguiente:

5 minutos 94° C,	desnaturalización
30 segundos 94° C	} 30 ciclos de amplificación *
30 segundos 61° C	
5 minutos 72° C,	extensión final

* Se suprimió la fase de amplificación a 72° C debido al pequeño tamaño del fragmento a amplificar y con el fin de evitar la aparición de bandas no específicas.

3.16 Aislamiento de ARN y análisis por *Northern blot*

El ARN total de muestras de tejidos se obtuvo mediante homogeneización activa (Politrón) en solución D, se purificó con fenol-cloroformo isoamílico y se precipitó con isopropanol (Chomczynski y Sacchi, 1987). El ARN total de células se aisló con el reactivo TRIzol (Gibco-BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras verificar la integridad del ARN en un gel-fosfato 15 mM pH 6.9 teñido con BrEt, se analizaron los ARNs mediante *Northern blot*.

Los ARNs (20-40 µg por muestra) se desnaturalizaron y se separaron en geles de agarosa del 1% con tampón formaldehído. Se transfirieron a membranas de nailon (Hybond-N+ Amersham Pharmacia Biotech) por capilaridad durante toda la noche en tampón SSC-10x. Las membranas se irradiaron durante 2 min con luz ultravioleta y se mantuvieron durante 2 h a 70° C. A continuación, las membranas se hibridaron a 42° C durante toda la noche con la sonda marcada radiactivamente con $\alpha^{32}\text{P}$ -dCTP, utilizando el sistema de marcaje Rediprime II (Amersham Pharmacia Biotech). Los filtros hibridados se sometieron a diversos lavados (según las sondas) con SCC 0.2x/SDS 0.1% a 55° C. Para hibridar el mismo filtro con varias sondas, el ADN marcado se eliminó mediante lavados en SCC 0.01x/SDS 0.01% en ebullición.

Para el análisis y detección de ARNs de pequeño tamaño (siRNAs de las construcciones de interferencia) se utilizaron 100 µg de ARN por muestra y se separaron en geles de poliacrilamida del 15% y 8 M de Urea (Sequagel Sequencing System; National Diagnostics) siguiendo las instrucciones del fabricante. La sonda se marcó utilizando 10 U del enzima Polinucleótido Kinasa (PNK, Roche) y $\gamma^{32}\text{P}$ -dATP y las membranas se hibridaron a 50° C. Los lavados se hicieron a 50° C con SCC 0.2x/SDS 0.1%. Se utilizó el marcador Decade Marker (Ambion) para comprobar el tamaño de las bandas obtenidas.

Las sondas utilizadas fueron: los ADNc de IKK α , 7S (ARN ribosómico, control de carga) y VEGF (Larcher y cols., 1998); fragmento ClaI de 600 pb de la zona 5' de HK10; fragmento BamHI de 500 pb de trombospondina 1; fragmento BamHI de 400 pb de trombospondina 2. Para los siRNAs se utilizó como sonda un oligonucleótido específico de la secuencia siRNA-IKK α 1 y U6 como control de carga. Para estudiar la expresión de H1-RNA, se utilizó como sonda un fragmento amplificado de 345pb conteniendo parte del gen que codifica para H1 (RPPH1); la sonda se amplificó por PCR a partir de los siguientes cebadores específicos 5'-ATA GGG CGG GAG GAA GCT CAT C-3' y 5'-ACC AAA AAT GGG CGG AGG AGA AGT AGT C-3' (Li y Williams,

1995), con las condiciones de PCR siguientes: desnaturalización a 94° C, 5 min; 30 ciclos de amplificación, siendo cada ciclo a 94° C, 30 seg; 60° C, 30 seg, 72° C, 30 seg; extensión final 72° C, 5 min.

La visualización de las hibridaciones con las diferentes sondas, así como la cuantificación de la intensidad de las bandas se realizó usando *Molecular Imager FX* (programa *Quantity One*, BioRad Laboratories).

3.17 Análisis de expresión por PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR)

El ARN total de las muestras se aisló con el reactivo TRIzol (Gibco-BRL) siguiendo las instrucciones del fabricante. A continuación se realizó un paso adicional de lavado y purificación del ARN mediante la utilización de columnas de extracción de ARN de Qiagen (RNeasy Mini Kit, Qiagen). La integridad y calidad del ARN se analizó en un Bioanalizador (Bioanalyzer 2100). Finalmente, la síntesis de ADNc (ADN complementario de una sola cadena) se realizó a partir de 1-2 µg de ARN total de las muestras, en un volumen final de 20 µl, a través del Kit de transcripción reversa de Roche, siguiendo las indicaciones descritas por el fabricante.

El análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa en tiempo real se realizó utilizando sondas Taqman MGB que contienen el indicador 6-FAM (6-FAM *reporter dye*) unido al extremo 5', siguiendo las instrucciones del fabricante (Applied Biosystems). Las sondas de los genes analizados fueron *Ikkα* (ref. Mm00432529_m1) y *Tbp* como control para normalizar la cuantificación (TATA box binding protein, ref. Mm00446973_m1). Como sustrato de la reacción se utilizó el ADNc obtenido previamente para cada una de las muestras. La reacción se realizó en un termociclador Rotor-Gene (Corbett Research) y las condiciones de reacción fueron: desnaturalización a 95° C, 10min; 40 ciclos de amplificación, siendo cada ciclo a 95° C, 15 seg; 60° C, 1 min.

Como paso previo a los análisis de expresión, se calcularon las eficiencias de la reacción correspondientes a los genes *Ikkα* y *Tbp* por medio de, al menos, 5 diluciones seriadas del ADNc sustrato y posterior cuantificación por RT-qPCR; de este modo se construye una recta patrón. La eficiencia se define como el valor que expresa las veces que se duplica el sustrato en cada ciclo (valor máximo de 1). Los valores obtenidos de la reacción para el gen *Ikkα* fueron normalizados con los valores del control *Tbp*.

Para calcular los niveles de expresión de CYLD-mutante por PCR cuantitativa se utilizaron unos oligonucleótidos específicos para el gen *CYLD* humano (5'-ACC AAG ATG CCC AAT ACC AA-3' y 5'-CCA ACG GAT TAC CCC ATA GA-3') y SYBR Green (Roche). Como control para normalizar la cuantificación se seleccionó el gen *β -actina* humano (LUX primers, Invitrogen). Las condiciones de PCR fueron: desnaturalización a 95° C, 3 min; 45 ciclos de amplificación, siendo cada ciclo a 95° C, 20 seg; 56° C, 20 seg y 72° C, 20 seg.

3.18 Análisis de cortes histológicos y cultivos celulares por inmunohistoquímica e inmunofluorescencia

Se utilizaron muestras fijadas en formol o etanol 70%, incluidas en parafina (cortes de 3-5 μ m realizados en un microtomo), tanto procedentes de tejidos de animales transgénicos y control como de tumores obtenidos en los ensayos de carcinogénesis y de pieles y tumores humanos. Para la detección de BrdU, se inyectó BrdU (100 μ g por cada gramo de peso del animal) intraperitonealmente en los animales 2 h antes de ser sacrificados. En el caso de cultivos celulares, se crecieron las células sobre cubres de vidrio o plástico hasta llegar a subconfluencia y se fijaron en formaldehído 4%, EtOH 70% ó Metanol : Acetona (1 : 1). Las muestras de pieles y tumores humanos (SCCs y ASCCs) fueron cedidas por los Departamentos de Patología del Hospital de Móstoles y Fundación Jiménez Díaz (Madrid).

Para los análisis por inmunohistoquímica, las muestras desparafinadas se preincubaron 30 min con 5% de suero de caballo en PBS para bloquear uniones inespecíficas. En el caso de la detección de BrdU, incubamos previamente las muestras en HCl durante 1h. A continuación, se incubaron durante 1 h a 37° C ó 18 h a 4° C con el anticuerpo primario correspondiente diluido en PBS-Tween 0.05% y con los secundarios durante 2 h a temperatura ambiente. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla 1. Los anticuerpos secundarios anti-IgG, conjugados con peroxidasa y especificidad para conejo, rata o ratón, procedían de Amersham. La detección del marcaje se realizó mediante el sistema avidina-estreptavidina-peroxidasa, utilizando el kit ABC (Vectastain, Vector Laboratories) y el sustrato DAB y H₂O₂ (Vector Laboratories).

Para los análisis por inmunofluorescencia, se utilizaron anticuerpos secundarios conjugados con fluorocromos; tras la incubación con los anticuerpos primarios y secundarios correspondientes, se montaron las muestras con moviol (Hoechst) al que se añadió DAPI (200 μ g/ml), para la detección de los núcleos. La visualización se realizó en un microscopio Zeiss con fuente de epifluorescencia y filtros adecuados.

Tabla1. Anticuerpos primarios para el análisis por Inmunohistoquímica

Especificidad	Dilución	Referencia o cedido por
BrdU	1:10	Roche
Cadherina-E	1:100	BD Bioscience, clon 36
Filagrina	1:1000	Covance, PRB-417P
IKK α	1:50	Santa Cruz, sc-7182
Involucrina	1:100	Sigma (SY5)
K1	1:500	Covance, PRB-149P Y PRB-165P
K10	1:20	Sigma (KS 8.60)
K13	1:250	Abcam (AE8)
K5	1:500	Covance, PRB-160P
K8	1:1	Dr. A. Alonso, TROMA1
Placoglobina	1:100	BD Bioscience, clon 15

3.19 Obtención de extractos proteicos y análisis por *Western blot*

3.19.1 Obtención de extractos proteicos totales

Los extractos proteicos totales de piel o de células en cultivo se obtuvieron mediante homogeneización activa (uso de Politrón) o pasiva (tres ciclos de congelación/descongelación) en tampón de lisis que contenía Tris-HCl 50mM pH 7.5, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, Tritón X-100 0.5% e inhibidores de proteasas (PMSF 1 mM, NaF 20mM, Pirofosfato Sódico 1 mM, Aprotinina 1 μ g/ml, Leupeptina 1 μ g/ml y Na_3VO_4 1mM). Los lisados se centrifugaron a 12000 rpm a 4° C 10 min y los sobrenadantes se transfirieron a tubos fríos. La concentración de proteínas se determinó mediante el análisis colorimétrico de Bradford (BioRad).

3.19.2 Fraccionamiento celular

Los extractos de proteínas citoplasmáticas de células en cultivo se obtuvieron mediante homogeneización pasiva (tres ciclos de congelación/descongelación) en tampón A (HEPES 10 mM pH 7.9, KCl 10 mM, EDTA 0.1 mM, EGTA 0.1 mM) con los inhibidores de proteasas descritos en el apartado 3.19.1. Tras 15 min de incubación a 4° C se añadió el detergente NP40 1%, se centrifugó durante 1 min a 2000 rpm y se recogieron los extractos citoplasmáticos del sobrenadante. La fracción sedimentada se resuspendió en tampón C (HEPES 20 mM pH 7.9, NaCl 0.4 M, EDTA 1mM, EGTA 1 mM, glicerol 25%) con inhibidores de proteasas, se incubó 15 min a 4° C, se centrifugó 5 min a 12000 rpm y se recogieron los extractos nucleares del sobrenadante. La concentración de proteínas se determinó mediante el análisis colorimétrico de Bradford (BioRad).

3.19.3 Inmunodetección de proteínas

Las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida-SDS con un porcentaje de acrilamida variable (entre el 8% y el 12%, según el peso molecular de las proteínas a detectar) y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Amersham Pharmacia Biotech) en cámara húmeda con medio de transferencia (Tris-base 33 mM, glicina 194 mM y metanol 20%). Las membranas se bloquearon 2 h con leche desnatada al 5% en TBS 1x-Tween 0.1% y se incubaron con los anticuerpos específicos diluidos en TBS 1x-Tween 0.1%, BSA 1%. Los anticuerpos primarios utilizados se detallan en la Tabla 2. Los anticuerpos secundarios anti-IgG, conjugados con peroxidasa, con especificidad variable (conejo, ratón y cabra) procedían de Amersham.

Tabla 2. Anticuerpos primarios para el análisis por *Western-blot*

Especificidad	Dilución	
Actina	1:1000	Santa Cruz, sc-1616
β -catenina	1:500	BD Bioscience, Clon 14
Cadherina-E	1:2000	BD Bioscience, clon 36
Ciclina D1	1:500	NeoMarkers, SP4
c-Myc	1:1000	Covance, 9E10
HA.11 (hemaglutinina)	1:1000	Covance, MMS-101P
I κ B α	1:200	Santa Cruz, sc-371
IKK α	1:250	Santa Cruz, sc-7182 y sc-7218
IKK β	1:1000	IMGEX, IMG-129
IKK γ	1:250	Santa Cruz, sc-8330
MMP-9	1:1000	Cell Signaling, G657
p50/p105	1:250	Santa Cruz, sc-114
p65	1:100	Santa Cruz, sc-8008
p65-P	1:500	Cell Signaling, 3031
Placoglobina	1:2000	BD Bioscience, clon 15
Podoplanina	1:200	Santa Cruz, sc-59347 (18H5)
Snail	1:200	Santa Cruz, sc-28199
Tubulina	1:2000	Sigma (B-5-1-2)

Para visualizar la unión de los anticuerpos se usó el kit West-PicoSignal (Pierce Biotechnology) siguiendo las instrucciones del fabricante. La cuantificación de las bandas en los casos requeridos se realizó usando el programa *Quantity One* (BioRad Laboratories).

3.20 Ensayo de depilación del lomo de ratón

Se anestesiaron los animales con 16 µl de avertina al 2.5% por cada g de peso del animal y se depiló el lomo de ratones de 24 días de edad, fecha correspondiente al final del primer telogén e inicio del segundo anagén aproximadamente (Kawabe y cols., 1991). Se realizó un seguimiento diario de crecimiento de pelo durante 11 días, hasta los 35 días de edad. Transcurrido ese tiempo los animales fueron sacrificados y se tomaron muestras de piel de lomo para realizar el análisis histológico de la piel de animales transgénicos y control.

3.21 Ensayos de carcinogénesis mediante inyección subcutánea de células en ratones inmunodeficientes

Se inyectaron de forma subcutánea 10^6 células PDVC57 o PB contenidas en 100 µl de PBS en los flancos derecho e izquierdo de cada animal (ratones Hsd: athymic nude-Foxn1^{nu}) y se emplearon 6 ó 7 animales para cada una de las poblaciones celulares estudiadas. Los tumores se midieron a distintos días desde su aparición calculando el volumen total según la fórmula $[(4\pi/3) \times (a/2)^2 \times (b/2)]$, donde a y b representan el eje mayor y menor del tumor respectivamente. El tiempo transcurrido desde la inoculación hasta la toma de muestras fue de 20 días en el caso de los tumores procedentes de las células PDVC57 y de 32 días en el caso de las células PB.

3.22 Carcinogénesis química en piel de ratón

Para el ensayo de carcinogénesis química en dos pasos en piel de ratón mediante tratamiento con DMBA/TPA se emplearon un total de 8 animales de 9 semanas de edad para cada genotipo; se les afeitó el lomo y al día siguiente se iniciaron mediante la aplicación tópica de una única dosis del carcinógeno DMBA (Sigma) (100 µg diluido en 200 µl de acetona) sobre la zona afeitada; 6 días después del tratamiento con DMBA, se comenzaron las aplicaciones con el promotor tumoral TPA (Sigma) (5 µg/200 µl acetona), dos veces por semana durante 12 semanas. Alrededor de la séptima semana tras la iniciación, se observó la aparición de tumores, realizándose un seguimiento semanal del número y tamaño de los mismos en cada animal.

En los ensayos de carcinogénesis química en fondo Tg.AC, se emplearon un total de 9 animales de 9 semanas de edad para cada genotipo, se les afeitó el lomo y al día siguiente se comenzó la aplicación de TPA (5 µg/200 µl acetona), hasta un total de dos veces por semana durante 10 semanas. Al igual que en el ensayo mediante DMBA/TPA, se realizó un seguimiento semanal del número y tamaño de los tumores en cada animal.

3.23 Ensayos de permeabilidad vascular

La permeabilidad vascular se analizó de acuerdo con lo descrito por Blázquez y cols., 2003. Los animales a estudiar (ratones inmunodeficientes portadores de tumores derivados de células inyectadas subcutáneamente) fueron inyectados con 150 µl de azul de Evans al 0.5% por vía venosa, analizando al cabo de 10 min la extravasación del colorante hacia la masa tumoral.

3.24 Microarrays

El análisis del patrón de expresión génica por *microarrays* se realizó en equivalentes de piel H-IKKα y H-Control de día 10 de diferenciación utilizando chips *Affymetrix* (Human Genome U133 Plus 2.0 Array). Se realizaron un total de cuatro *arrays* independientes (dos *arrays* de H-IKKα y dos de H-Control), procedentes cada uno de dos equivalentes de piel diferentes (de esta manera, para cada *array* se utilizó la mezcla de dos ARNs diferentes) con objeto de obtener datos lo más representativos posible. El ARN total de las muestras se aisló tal y como se ha descrito en el apartado 3.17 (RT-pPCR). La integridad y calidad del ARN se analizó en un Bioanalizador (Bioanalyzer 2100). Las muestras se enviaron para analizar a la Unidad de Genómica y Proteómica del Centro de Investigación del Cáncer (Salamanca) y los ficheros “.CEL” obtenidos fueron procesados en nuestro laboratorio utilizando el programa *Bioconductor* (Gentleman y cols., 2004). Los datos se normalizaron utilizando RMA y se analizó la expresión con el módulo Limma (Smyth, 2004). Se seleccionaron genes con niveles de inducción o represión superiores a 1.5 veces y un valor $p < 0.05$. La clasificación en categorías funcionales, según la base de datos *Gene Ontology*, se realizó utilizando la herramienta DAVID (Dennis y cols., 2003). Las categorías ontológicas se seleccionaron atendiendo a procesos biológicos (BP) y componente celular (CC) y se seleccionaron aquellas que daban un valor $p < 0.05$ y un número de genes igual o superior a cuatro.

3.25 Análisis estadístico

Los datos se representan como la media aritmética \pm error estándar de la media. La significación de las diferencias entre los grupos fue determinada utilizando el análisis t de *Student* y el test W Mann Whitney (Wilcoxon). Se consideraron diferencias estadísticamente significativas aquellas con valor $p < 0.05$. El procesamiento y los análisis estadísticos fueron realizados usando el programa informático *Statgraphics Plus* (Maugistics Inc., Rockville, MD, USA)

4 RESULTADOS

4.1 Estudio funcional de IKK α en líneas de queratinocitos

Diversos experimentos han mostrado que la subunidad IKK α es un factor necesario para la morfogénesis epidérmica. Sin embargo, pese a la existencia de modelos animales portadores de mutaciones nulas del gen que codifica para esta subunidad, el conocimiento de su función en la fisiología de la piel es limitado, dado que los animales mutantes mueren durante el desarrollo embrionario o en las primeras horas de vida postnatal. Por este motivo hemos utilizado otras aproximaciones complementarias. Nuestros estudios han ido encaminados inicialmente a analizar las consecuencias de un incremento en los niveles de expresión de la subunidad IKK α de ratón en la línea celular de queratinocitos humanos HaCaT. Estas células tienen la propiedad de diferenciar *in vitro* cuando se cultivan en ausencia de suero, por lo que suponen un modelo de diferenciación epidérmica. También permiten ser cultivados sobre geles de fibrina con fibroblastos embebidos, dando lugar a lo que denominaremos equivalentes de piel, que se asemejan en gran medida, en cuanto a su arquitectura, a una piel normal.

4.1.1 IKK α acelera la diferenciación de los queratinocitos humanos

La línea de queratinocitos humanos HaCaT tiene la peculiaridad de diferenciar *in vitro* en condiciones de ausencia de suero y subconfluencia celular, tal y como demuestran su estratificación en estas condiciones y la inducción de la expresión de marcadores de diferenciación, como la queratina K10 (HK10) (Paramio y cols., 2000). En las etapas iniciales del proceso de diferenciación *in vitro* se aprecian cambios morfológicos en las células en cultivo, que progresivamente van estratificando, originando cúmulos aleatorios de estratificación. Utilizamos este modelo de diferenciación *in vitro* para estudiar el efecto de IKK α en el proceso de diferenciación epidérmica.

Transfectamos las células HaCaT con el vector pRC- β Actin-3xHA-IKK α y obtuvimos las poblaciones celulares denominadas H-IKK α -Pool, H-IKK α -2c y H-IKK α -3c (que proceden de unos 60, 2 y 3 clones diferentes respectivamente). Como control se utilizaron las células HaCaT transfectadas con el vector pBZ (H-Control). Comprobamos la expresión del transgén en las tres poblaciones H-IKK α mediante *Western blot* e inmunohistoquímica, con anticuerpos específicos para el epítipo HA e IKK α (figura 12). De este modo, observamos que la transfección estable del vector de expresión de IKK α en la línea de queratinocitos HaCaT producía un incremento en la expresión de esta proteína, de más de 3 veces, respecto a la expresión en las células H-Control.

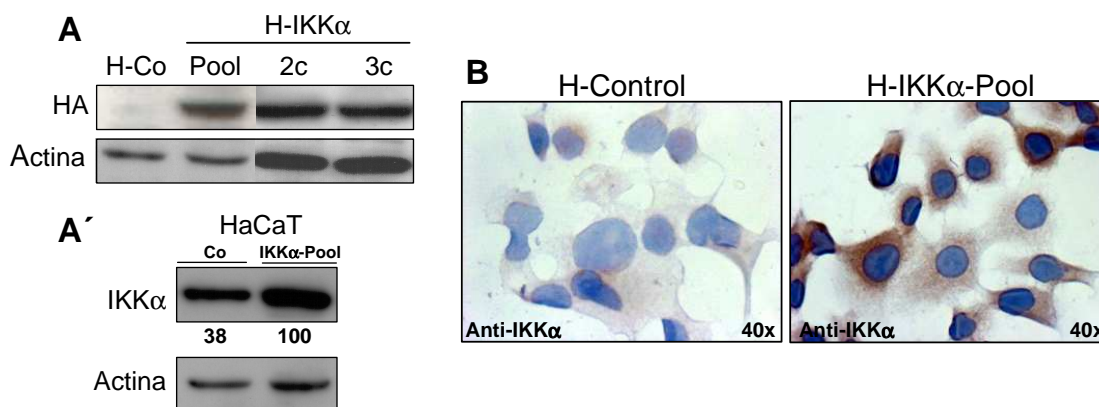


Figura 12. Sobreexpresión de IKKα en transfectantes estables de la línea de queratinocitos humanos HaCaT (H-IKKα). (A) Análisis de la expresión del transgén en las tres poblaciones H-IKKα obtenidas (H-IKKα-Pool, H-IKKα-2c y H-IKKα-3c) mediante *Western blot*. (A') Expresión de IKKα en células H-IKKα-Pool respecto al control. Se indica el nivel de expresión de IKKα en cada caso referido a su nivel de carga correspondiente, determinado con el anticuerpo anti-actina, y representado en unidades arbitrarias. (B) Tinción inmunohistoquímica con el anticuerpo anti-IKKα de células en cultivo H-IKKα-Pool y H-Control.

Cultivamos las poblaciones H-IKKα y H-Control en condiciones de diferenciación y confirmamos por *Western blot* que las células H-IKKα mantenían la sobreexpresión de IKKα (figura 13-A'). Los estudios de diferenciación temprana demostraron que las células transfectadas con IKKα experimentan una diferenciación acelerada respecto a las células control, ya que se observaron cúmulos de estratificación bien diferenciados en los cultivos H-IKKα en el día 8 (e incluso en días anteriores), mientras que en las células H-Control no aparecieron hasta el día 14, siendo en este momento muy rudimentarios (Figura 13-B, flechas). Como análisis complementario, estudiamos por *Northern blot* la expresión de la queratina K10, marcador temprano de diferenciación epidérmica, a distintos días de diferenciación en H-IKKα-Pool y H-Control. En el día 6 ya se observó un alto nivel de expresión de este marcador de diferenciación en H-IKKα-Pool, mientras que en H-Control hasta el día 13 no se apreció un aumento de K10 de esta magnitud. Por lo tanto, el análisis del nivel de expresión de K10 confirmó la diferenciación acelerada de las células que expresaban niveles elevados de IKKα observada por criterios morfológicos (figura 14 A, B).

También estudiamos la diferenciación terminal en los cultivos H-IKKα-Pool y H-Control en distintos días, analizando la presencia de corneocitos en el cultivo. Los corneocitos son queratinocitos aplanados y sin núcleo (escamas), en un estadio terminal de diferenciación. A día 9 de diferenciación encontramos abundantes corneocitos en H-IKKα-Pool mientras que no se observaron en el control (figura 14-C). En el día 16 de diferenciación se observó que el número de corneocitos en H-IKKα era muy superior al encontrado en las células control ($125 \pm 10.7 \times 10^4$ frente a $1.5 \pm 0.9 \times 10^4$ por ml; $p < 0.01$).

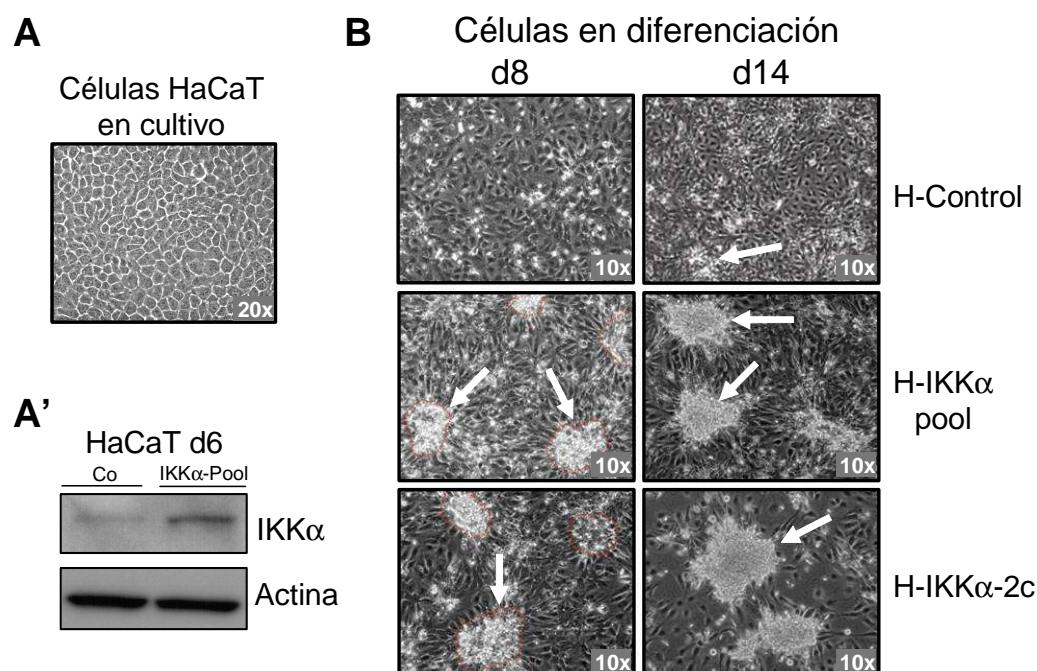


Figura 13. Diferenciación acelerada en los clones H-IKK α en el modelo de diferenciación *in vitro*. (A) Apariencia de los queratinocitos HaCaT en un cultivo convencional en placa. (A') Análisis del nivel de expresión de IKK α en el día 6 de diferenciación en H-IKK α -Pool y H-Control mediante *Western blot*. (B) Células H-IKK α -Pool, H-IKK α -2c y H-Control en condiciones de diferenciación. En las células control se observan, en el día 8, cambios morfológicos debidos a la diferenciación y en el día 14 aparecen los primeros focos de estratificación de pequeño tamaño (flecha). En las células H-IKK α -Pool y H-IKK α -2c ya en el día 8 se apreciaron áreas de diferenciación con grandes cúmulos de estratificación, siendo más evidentes en el día 14 (flechas). Este mismo resultado se obtuvo con H-IKK α -3c (no mostrado).

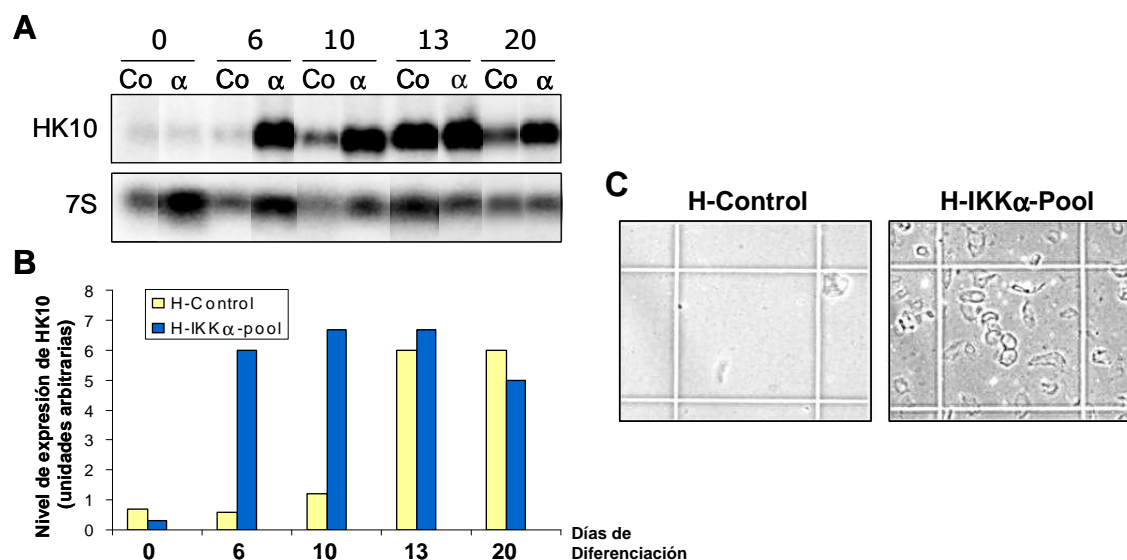


Figura 14. La sobreexpresión de IKK α en queratinocitos produce una aceleración en su diferenciación y permite la aparición de diferenciación terminal en los cultivos *in vitro*. (A) Análisis del nivel de ARN mensajero de la queratina HK10 en H-IKK α -Pool (α) y H-Control (Co) por *Northern blot*. Como control de carga se utilizó una sonda para el ARN ribosómico 7S. (B) Cuantificación densitométrica de los niveles relativos de expresión de K10, corregidos por las señales obtenidas para 7S. (C) Imagen representativa del número de corneocitos presentes en el medio de cultivo de H-IKK α -Pool y H-Control en el día 9 de diferenciación. La imagen fue tomada en un microscopio de contraste de fase.

En conjunto, estos resultados demuestran el papel esencial de IKK α en el proceso de diferenciación, ya que acelera la diferenciación temprana (medida como la aparición de cúmulos de estratificación y expresión de K10) y permite que se alcance la diferenciación terminal (medida como la presencia de corneocitos) hasta un nivel que no se observa en las células control en el sistema de diferenciación *in vitro* utilizado. Debido a que los estudios de diferenciación realizados en las tres poblaciones H-IKK α dieron resultados muy similares en todos ellos, seleccionamos las células H-IKK α -Pool para los siguientes análisis, salvo que se indique lo contrario.

4.1.2 La vía de señalización NF- κ B no parece ser responsable de los cambios en diferenciación de las células H-IKK α

Al ser IKK α un miembro de la vía de señalización de NF- κ B, nos planteamos la posibilidad de que los efectos de IKK α sobre la diferenciación de los queratinocitos pudieran ser debidos a una alteración en la actividad de NF- κ B en las células H-IKK α , aunque todos los estudios previos realizados por otros autores concluyen que IKK α ejerce su papel sobre la diferenciación de los queratinocitos de forma independiente de la vía de NF- κ B (Hu y cols., 2001). Para conocer el estado de los miembros de la vía de NF- κ B en nuestro modelo celular, analizamos por *Western blot* extractos proteicos de células H-IKK α respecto al control. El análisis mostró un ligero aumento en la cantidad de IKK β , miembro del complejo IKK, así como del represor I κ B α y de p65 en las células H-IKK α (figura 15-A).

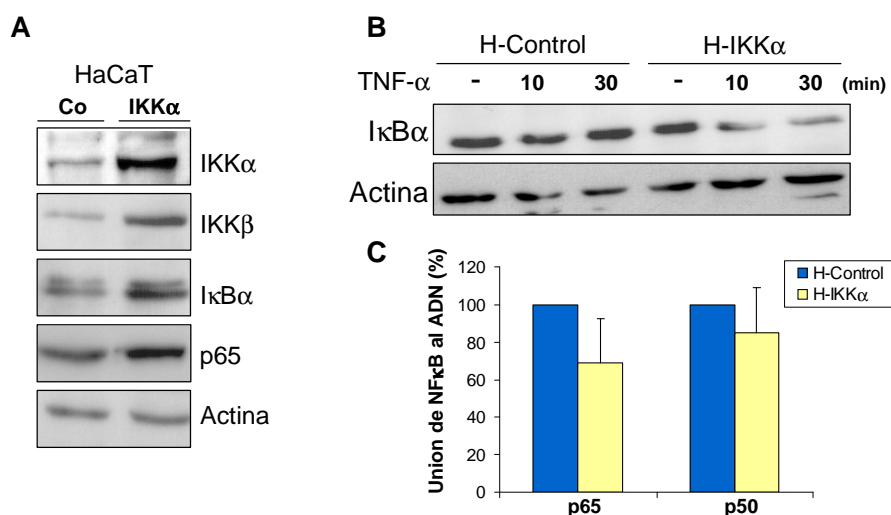


Figura 15. La sobreexpresión de IKK α en células HaCaT no induce cambios significativos en la vía clásica de señalización de NF- κ B. (A) Análisis de la expresión de algunos de los miembros de la vía de señalización de NF- κ B –IKK α , IKK β , I κ B α , p65– a partir de extractos proteicos de células H-IKK α y H-Control mediante *Western blot*. (B) Cinética de degradación de I κ B α tras el tratamiento con TNF- α . (C) Actividad de unión de NF- κ B (subunidades p50 y p65) al ADN mediante un ensayo colorimétrico a partir de extractos nucleares de H-IKK α y H-Control. Se representa el porcentaje de los niveles obtenidos para H-IKK α relativos al control (promedio de dos experimentos).

La estimulación de las células con TNF- α , lleva a una degradación del represor I κ B α y al consiguiente incremento de la actividad NF- κ B; la disminución de los niveles de I κ B α es transitoria, ya que al ser I κ B α un gen regulado por NF- κ B, su expresión vuelve a subir, de manera que cesa el incremento de actividad NF- κ B. El estudio de la abundancia de I κ B α a diferentes tiempos tras la estimulación con TNF- α mostró una mayor degradación de I κ B α (y un retraso en la nueva síntesis) en las células H-IKK α respecto al control (figura 15-B). Los resultados mostrados en la figura 15-A podrían indicar un aumento de actividad NF- κ B. Con objeto de estudiar específicamente este parámetro, analizamos la capacidad de unión al ADN de NF- κ B (subunidades p50 y p65) presente en extractos nucleares. Los resultados indicaron una actividad NF- κ B equivalente en las células H-IKK α respecto al control (figura 15-C), lo cual sugiere que los cambios en la capacidad de diferenciación observados en las células con niveles elevados de IKK α no son debidos a un incremento en la actividad NF- κ B.

4.1.3 IKK α regula la diferenciación de los queratinocitos por un mecanismo dependiente de cadherina-E

Para determinar el mecanismo molecular por el que IKK α ejerce su función en diferenciación, estudiamos en las células H-IKK α y H-Control la expresión de varias moléculas relevantes en la diferenciación de queratinocitos. Entre ellas se encuentra la molécula de adhesión cadherina-E, una proteína esencial para el desarrollo y la diferenciación epidérmica, tal y como lo han puesto de manifiesto estudios *in vivo* e *in vitro* (Jensen y cols., 1997); la ausencia de cadherina-E en la epidermis causa defectos en la diferenciación terminal e incluso provoca muerte perinatal por pérdida de agua (Young y cols., 2003; Tinkle y cols., 2004; Tunggal y cols., 2005).

Analizamos la expresión de cadherina-E mediante *Western blot* e inmunofluorescencia y observamos un incremento sustancial de esta proteína en los queratinocitos que expresan niveles elevados de IKK α (figura 16 A, B). La molécula de adhesión placoglobina (γ -catenina), que se asocia a cadherina-E, también estaba incrementada en las células H-IKK α . Sin embargo, este aumento en los niveles de cadherina-E no viene mediado por inhibición de la expresión de Snail, represor transcripcional y principal regulador negativo de cadherina-E, ya que el análisis por *Western blot* mostró que Snail no se expresaba en las células H-Control, mientras que en las células H-IKK α se inducía ligeramente (figura 16-A). Por otro lado, la expresión de β -catenina estaba aumentada en las células H-IKK α (en concordancia con la disminución de β -catenina observada en la epidermis de ratones *knockouts* para cadherina-E en piel)

(Tinkle y cols., 2004). Finalmente analizamos los niveles de ciclina D1 y c-Myc, dianas transcripcionales de β -catenina, y observamos un incremento en la expresión de ciclina D1 en H-IKK α respecto al control, aunque para c-Myc los valores fueron similares en ambas poblaciones celulares (figura 16-A).

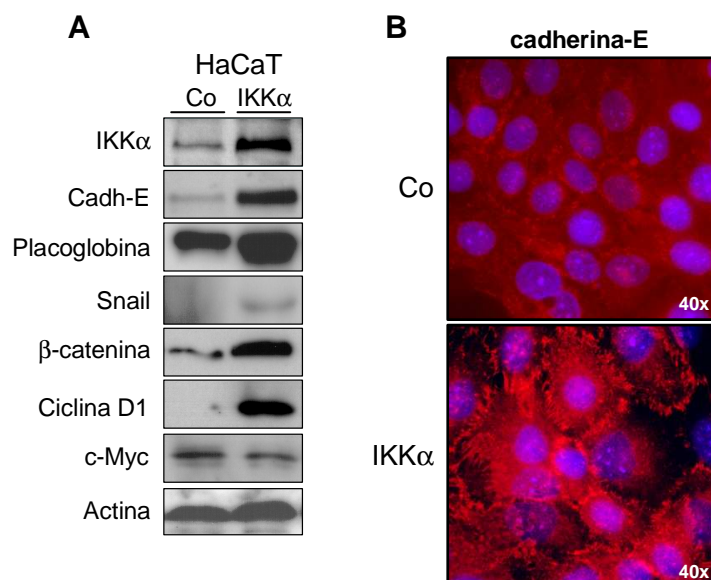


Figura 16. Aumento de los niveles de expresión de cadherina-E, placoglobina (γ -catenina), β -catenina y ciclina D1 en células H-IKK α . (A) Análisis de la expresión de las proteínas indicadas por *Western blot*, a partir de extractos totales de células H-IKK α y H-Control. Se utilizaron anticuerpos específicos en cada caso. (B) Inmunofluorescencia de células H-IKK α y H-Control, en cultivo convencional, con un anticuerpo específico contra cadherina E.

Para comprobar la relación de cadherina-E con el incremento en la diferenciación de los queratinocitos promovido por la sobreexpresión de IKK α , estudiamos si el bloqueo de la actividad funcional de cadherina-E podría frenar la diferenciación acelerada que observamos en los queratinocitos H-IKK α . Para ello, utilizamos un anticuerpo específico contra esta proteína y bloqueante de su actividad. Las células H-Control y H-IKK α fueron incubadas durante 7 días en presencia de 20 μ g/ml de un anticuerpo anti-cadherina-E, de una concentración equivalente de IgG control o en ausencia de ellos, realizándose un seguimiento diario de la diferenciación celular. Las células H-IKK α incubadas con IgG control o sin anticuerpo añadido en el medio mostraron cúmulos de estratificación en el día 4, que fueron más evidentes en el día 7 (figura 17). Sin embargo, las células H-IKK α incubadas con el anticuerpo anti-cadherina-E no mostraron signos de estratificación a los 4 ni a los 7 días desde el inicio del experimento. La incubación de las células H-IKK α con una menor concentración de anticuerpo anti-cadherina-E (5 y 10 μ g/ml), sí permitió la formación de cúmulos de estratificación, pero con 6 días de retraso respecto a las células sin tratar o incubadas con IgG control. En las células H-Control, como era de esperar, no se apreciaron cambios en la diferenciación como consecuencia de la incubación con los distintos anticuerpos,

permaneciendo sin formar focos de estratificación en todos los casos y en los periodos de tiempo analizados. Estos resultados indican que cadherina-E tiene un papel fundamental como mediador del efecto de IKK α sobre la diferenciación de los queratinocitos, ya que el bloqueo parcial de la función de cadherina-E inhibe parcialmente la diferenciación inducida por IKK α , mientras que ésta es completamente inhibida con un bloqueo mayor.

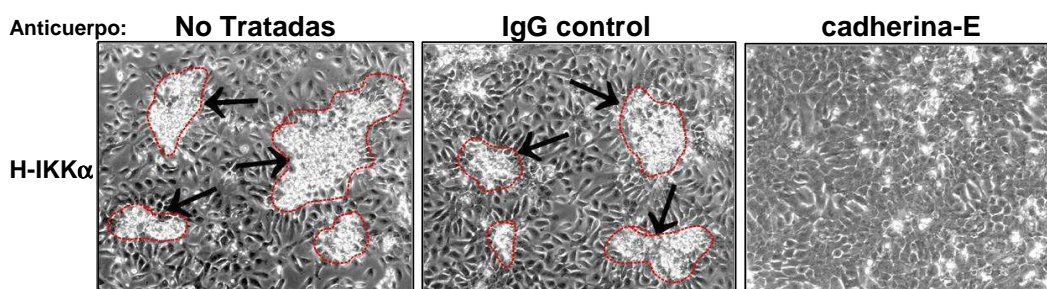


Figura 17. Inhibición de la estratificación en H-IKK α mediante el bloqueo de cadherina-E. Apariencia de los queratinocitos H-IKK α crecidos durante 7 días en condiciones de diferenciación e incubadas con 20 μ g/ml del anticuerpo bloqueante anti-cadherina-E, 20 μ g/ml de IgG control o células sin tratar. Las líneas en rojo y las flechas indican los cúmulos de estratificación.

4.1.4 IKK α incrementa las propiedades proliferativas y clonogénicas de las células HaCaT

Ciclina D1 es uno de los principales reguladores del ciclo celular que lleva a las células hacia un estado proliferativo (Sherr, 1996), y dado que su expresión está incrementada en las células H-IKK α , analizamos la capacidad proliferativa en cultivos convencionales en monocapa de las poblaciones H-IKK α -Pool, H-IKK α -2c y H-IKK α -3c respecto al control mediante varios ensayos diferentes. Primero, realizamos curvas de crecimiento para las células H-IKK α -Pool, H-IKK α -2c y H-Control sembradas a baja densidad. Se observó en todos los genotipos que la fase de crecimiento exponencial no comenzaba hasta aproximadamente las 48 h de cultivo. Pasadas 72 h el perfil de la curva de crecimiento de los transfectantes que sobreexpresan IKK α cambiaba respecto al control, observándose un rápido incremento del número total de células, siendo éste más elevado en H-IKK α -Pool (figura 18-A). De acuerdo con este resultado, las células H-IKK α -Pool mostraron un incremento del 50% respecto al control en ensayos de incorporación de BrdU a las 48 h de cultivo (figura 18-B). Por otro lado, en ensayos de formación de colonias (en los que se siembran 500 células y se observa la formación de colonias a las 3 semanas), las tres poblaciones H-IKK α originaron mayor número de colonias y de mayor tamaño que la población control, lo que indica también una mayor capacidad proliferativa a largo plazo (figura 18 C, D). El ensayo de TUNEL para medir la cantidad de células en apoptosis no reflejó diferencias entre H-IKK α -Pool y el control, por lo que estas diferencias en el número de células no son debidas a cambios en la tasa

de muerte celular por apoptosis (no mostrado). Todos estos resultados indican que IKK α produce un incremento en la proliferación de los queratinocitos en cultivos convencionales en monocapa, de acuerdo con el aumento en los niveles de ciclina D1 observado en las células H-IKK α .

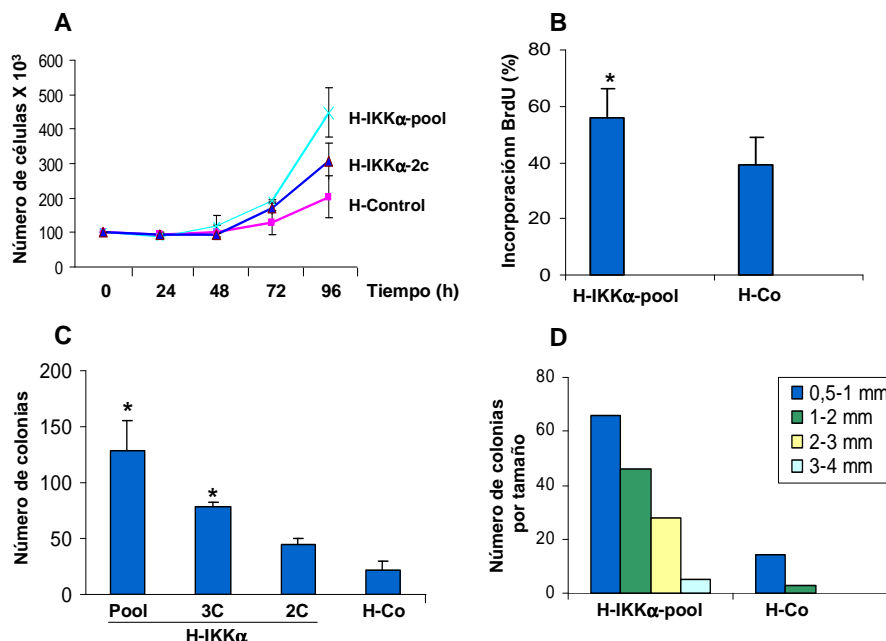


Figura 18. Incremento de la capacidad proliferativa en los transfectantes estables H-IKK α . (A) Curvas de crecimiento de las poblaciones H-IKK α -Pool, H-IKK α -2c y H-Control durante 96 h de cultivo. (B) Incorporación de BrdU en H-IKK α -Pool y H-Control medida a las 48 h de cultivo. (C y D) Medida de la eficiencia en la formación de colonias para los transfectantes estables H-IKK α y H-Control (C) y de la distribución de las colonias por tamaño (ejemplo representativo) en H-IKK α -Pool y H-Control (D). Los resultados son representativos de tres experimentos independientes. * Diferencias estadísticamente significativas con respecto a H-Control ($p < 0.05$).

4.1.5 Diferenciación alterada de H-IKK α e incremento de la capacidad invasiva en un modelo de equivalentes de piel

En el apartado 4.1.1 describimos la diferenciación acelerada de las células H-IKK α en cultivos *in vitro* en ausencia de suero. Estos cultivos se mantuvieron en condiciones de diferenciación durante 20 días. Sin embargo, resultó llamativo que los cultivos H-IKK α empiezan a mostrar signos de degeneración, caracterizados por una disgregación de los cúmulos de estratificación, a partir del día 16. Por este motivo, nos planteamos la realización de cultivos que permitieran estudiar la diferenciación de las células H-IKK α a más largo plazo, así como el análisis de la estratificación durante el proceso de diferenciación. Realizamos para ello equivalentes de piel, con componentes dérmicos y epidérmicos, que mimetizan *in vitro* la estructura de una piel normal. En estos cultivos los queratinocitos estratifican y diferencian sobre una matriz dérmica, constituida por fibrina con fibroblastos embebidos (Del Rio y cols., 2002) (ver apartado 3.4.2). El análisis de los equivalentes de piel originados a partir de H-IKK α y H-Control,

demostró una vez más la importancia de IKK α en el proceso de diferenciación epidérmica. En el día cero de cultivo se observó una monocapa de células tanto en H-Control como en H-IKK α , indicativo del correcto crecimiento de las células HaCaT sobre el lecho dérmico. Comprobamos por *Western blot* la expresión del epítipo HA en H-IKK α , así como la expresión de IKK α en ambos genotipos, observando una mayor expresión de IKK α en H-IKK α que en H-Control, al igual que ocurría en los cultivos celulares (figuras 19-A y 20 P, Q).

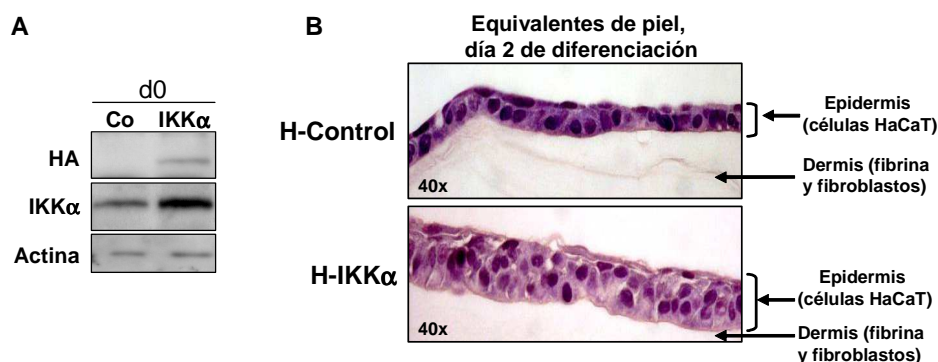


Figura 19. Aumento de la estratificación en los equivalentes de piel H-IKK α . (A) Análisis del nivel de expresión del epítipo HA y de IKK α en extractos proteicos de los equivalentes H-IKK α y H-Control por *Western blot*. Como control de carga se utilizó el anticuerpo anti-actina. (B) Tinción H/E mostrando la apariencia de los equivalentes de piel H-Control y H-IKK α en el día 2 de diferenciación.

El análisis histológico de los equivalentes de piel obtenidos mostró, de acuerdo con los resultados obtenidos en los cultivos en placa, que las células H-IKK α estratifican más rápidamente que las células H-Control, pudiendo observarse mayor número de capas de células en el día 2 de diferenciación. Así, mientras que en los equivalentes H-Control se detectaba una capa de células basales y otra superficial (en la que se distinguía la presencia de células con núcleos aplanados), en los equivalentes H-IKK α se distinguía un epitelio formado por 3 ó 4 capas de queratinocitos organizados en tres estratos bien diferenciados –estrato basal formado por una capa de células cilíndricas y núcleos grandes, estrato suprabasal con 1 ó 2 capas de células con núcleo más pequeño y citoplasma poligonal y estrato superficial formado por células con núcleos aplanados– (figura 19-B). El seguimiento de la evolución de estos equivalentes indicó que, en el día 6 de diferenciación, el epitelio de H-Control presentaba 3 ó 4 capas (figura 20-A), mientras que en el día 12 de diferenciación no se observó incremento en la estratificación (figura 20-C). Por el contrario, el epitelio de H-IKK α presentó 4 ó 5 capas de queratinocitos en el día 6 de diferenciación (figura 20-B), que aumentaba a 6 ó 7 capas en el día 12 (figura 20-D), y con una estratificación muy desorganizada (displásica) en amplias zonas del epitelio (que contrasta con la estratificación columnar de los equivalentes H-Control). A tiempos tempranos (6 días de diferenciación), se observaron importantes alteraciones morfológicas en los equivalentes de piel H-IKK α , destacando la

presencia de espongiosis (edema intercelular epidérmico) que afectaba a la capa basal y primeras capas suprabasales (figura 20-B, triángulos). Se comprobó además que este fenotipo era aún más acusado en el día 12 de diferenciación (figura 20-D, triángulos). Este fenotipo recuerda al que presenta la piel de pacientes de pénfigo vulgar, como se comentará en el apartado de discusión. También se detectó un crecimiento invasivo de los queratinocitos H-IKK α en la dermis subyacente, que no observamos en H-Control en ningún caso (figura 20 E, F).

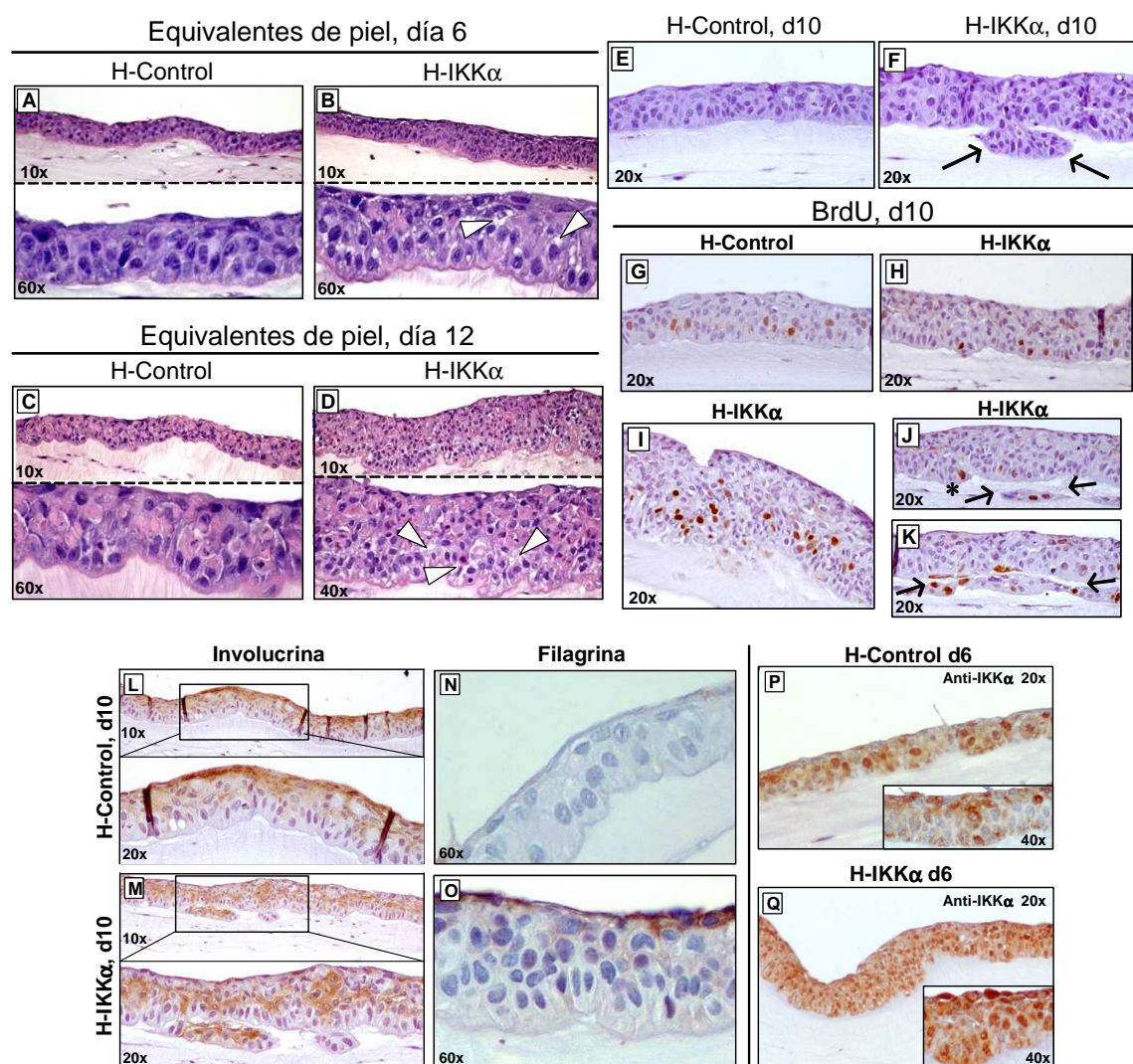


Figura 20. IKK α induce un aumento de la diferenciación de los equivalentes de piel en células HaCaT. (A-F) Tinción H/E de los equivalentes de piel H-Control y H-IKK α en los días 6, 10 ó 12 de diferenciación. Destaca el mayor número de capas en H-IKK α (B), así como la presencia de espongiosis intercelular (D; triángulos). También se observa invasión de los queratinocitos epidérmicos hacia la dermis en H-IKK α (F, flechas). (G-K) Ensayo de proliferación medido por la incorporación de BrdU en equivalentes de piel H-Control y H-IKK α . En las regiones de los equivalentes H-IKK α sin fenotipo no se aprecian diferencias respecto al control (G, H). Se observa mayor incorporación de BrdU en las células basales que invaden el gel de fibrina (J, K) y en las regiones con estratificación desorganizada o con espongiosis en H-IKK α (I). (L-Q) Análisis de los marcadores de diferenciación involucrina (L, M) y filagrina (N, O) en el día 10 de diferenciación mediante tinción inmunohistoquímica. También se muestra la expresión de IKK α en los equivalentes H-IKK α y H-Control de día 6 por tinción con el anticuerpo anti-IKK α (P, Q).

Respecto a la diferenciación del epitelio, se observó que la diferenciación temprana, analizada como expresión de queratina K10 (no mostrado) e involucrina, en los equivalentes de piel H-IKK α parecía ser más caótica, posiblemente debido a la estratificación desordenada (figura 20 L, M). Se analizó la expresión de filagrina, marcador de diferenciación terminal, y se encontró que ésta se expresaba de forma claramente detectable en algunas regiones de los equivalentes H-IKK α , mientras que en los controles no se llegó a distinguir (figura 20 N, O). Este resultado está en concordancia con los datos obtenidos en la diferenciación terminal en placa medida como presencia de corneocitos en el medio (figura 14-C).

Se realizaron estudios de proliferación, medida como incorporación de BrdU, en equivalentes de piel de 10 días de diferenciación. Se observó que las zonas con una estratificación similar en los equivalentes H-IKK α y H-Control tenían una tasa proliferativa muy parecida (figura 20 G, H). Sin embargo, en los equivalentes de piel H-IKK α llamó la atención la presencia de una mayor proporción de células que incorporaban BrdU en los focos de células basales que presentaban una tendencia a la invaginación (figura 20-J, asterisco); y en las que las células habían invadido el gel de fibrina subyacente (figura 20 J, K; flechas). También se observó mayor proliferación en las zonas con estratificación desorganizada y espongirosis intercelular de los equivalentes de piel H-IKK α (figura 20-I).

Al analizar los equivalentes de piel de 10-12 días, se apreció una disminución considerable en el grosor de la parte dérmica, es decir del gel de fibrina, en el caso de los queratinocitos H-IKK α (aproximadamente el 50% de las veces). Esta observación, junto con el incremento en la capacidad invasiva de las células H-IKK α comentado anteriormente (figura 20-F), nos llevó a estudiar la actividad metaloproteasa en el medio de cultivo de los equivalentes de piel. Se realizaron gelatinogramas (zimogramas para detectar la actividad gelatinolítica de las metaloproteasas MMP-2 y MMP-9) a distintos días de cultivo y los ensayos mostraron una mayor actividad MMP-9 en el medio de cultivo de H-IKK α respecto del control (figura 21-A), mientras que la actividad MMP-2 no sufría grandes cambios. También comprobamos por *Western blot* un incremento en la expresión de MMP-9, acorde con el aumento observado en su actividad (figura 21-B). Estos resultados indicarían que MMP-9 podría ser una de las moléculas responsables de la degradación del gel de fibrina en los equivalentes H-IKK α . Se ha descrito que Snail puede aumentar la expresión de genes de la matriz extracelular (entre ellos de MMP-9) (Jorda y cols., 2005), por lo que también analizamos su expresión. Comprobamos que, efectivamente, al igual que en los cultivos en placa de células H-IKK α , los equivalentes H-IKK α expresaban Snail, mientras que no se detectó en los controles (figura 21-B).

Pensamos que este aumento en la expresión y actividad de MMP-9 podría ser debido al aumento en el nivel de expresión de Snail observado en los equivalentes de piel H-IKK α .

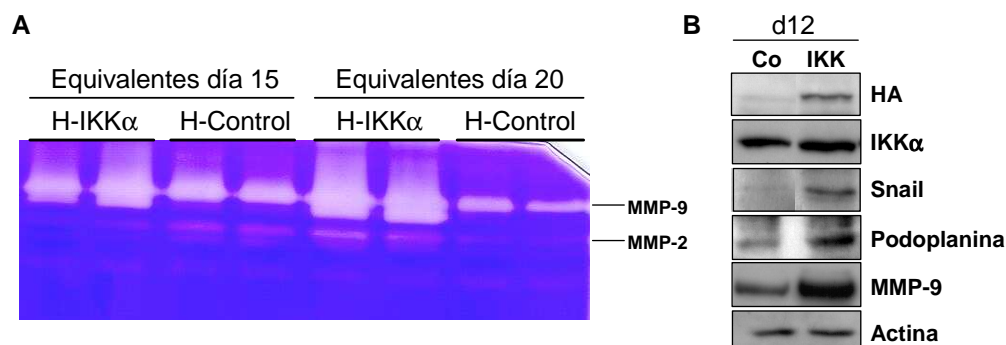


Figura 21. Los equivalentes H-IKK α poseen incrementada la actividad metaloproteasa MMP-9, así como los niveles de Snail y podoplanina. (A) Análisis de la actividad metaloproteasa en el medio sobrenadante de los equivalentes de piel de día 15 y 20, medida mediante un zimograma. (B) Análisis del nivel de expresión del epítipo HA y de las proteínas IKK α , Snail y podoplanina en extractos proteicos de los equivalentes H-IKK α y H-Control de día 12 por *Western blot*.

El estudio de los equivalentes de piel, para analizar la función que desempeña IKK α en la proliferación y diferenciación de los queratinocitos, nos ha llevado a las mismas conclusiones que el estudio de los cultivos tradicionales en monocapa. El obtener resultados equivalentes por medio de dos aproximaciones diferentes confirma la verosimilitud de nuestros datos y demuestra que ambas aproximaciones son válidas. La utilización de los equivalentes de piel nos ha permitido encontrar además otras propiedades que confiere IKK α a los queratinocitos (tendencia a la invaginación o espongiosis intercelular) que no se habrían podido detectar sin su empleo.

4.1.6 Análisis del patrón de expresión génico en equivalentes de piel

Realizamos un estudio comparativo por *microarrays* de los perfiles de expresión génica en los equivalentes de piel H-IKK α y H-Control de 10 días de diferenciación. El número total de genes con expresión aumentada en H-IKK α fue de 227 y el de genes reprimidos fue de 169. Un primer análisis demostró que el incremento en la expresión de IKK α induce cambios en la expresión de numerosos genes implicados en desarrollo epidérmico y en la diferenciación de los queratinocitos, como era esperable ante los resultados anteriormente expuestos, así como en la respuesta inmune y la adhesión celular (tabla 3 y Anexo I). En la clasificación por localización celular destaca la inducción de genes que se expresan en la envuelta cornificada, entre ellos el gen que codifica para cornifelina, proteína que se expresa de forma abundante en determinadas condiciones patológicas de la piel como es en el caso de la psoriasis (Michibata y cols., 2004). Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos del estudio de la diferenciación en placa (aceleración de la diferenciación por expresión de IKK α ;

apartado 4.1.1) y con aquellos que describen un papel fundamental de IKK α en la morfogénesis epidérmica y en la formación de la barrera epidérmica (Hu y cols., 1999; Li y cols., 1999a; Takeda y cols., 1999; Gareus y cols., 2007); también evidencian el papel fundamental de los queratinocitos en funciones inmunológicas de la piel. Además, encontramos diferencias en genes implicados en proteólisis, que podrían explicar la degradación del gel de fibrina en los equivalentes H-IKK α , y en genes que participan en fenómenos invasivos, entre los que destacamos el gen *podoplanina* (Wicki y cols., 2006), cuyo incremento comprobamos además por *Western blot* en los equivalentes H-IKK α (figura 21-B), y *twist1* (Yang y cols., 2004) (ver Anexo I), que confirmarían el incremento en la capacidad invasiva observada en las células H-IKK α (apartado 4.1.5).

Total genes inducidos 227 ; Total genes reprimidos 169			
Clasificación por Procesos Biológicos (GO:BP)			
GENES INDUCIDOS			
Categoría Funcional	Nº de genes	Porcentaje	Valor de p
Desarrollo epidérmico	11	5,73%	1,07E-08
Diferenciación de queratinocitos	5	2,60%	7,86E-06
Desarrollo	38	19,79%	4,08E-05
Diferenciación celular	17	8,85%	6,90E-05
Respuesta inmune	21	10,94%	2,76E-04
Señalización célula-célula	15	7,81%	0,001581
Respuesta a estrés	22	11,46%	0,002838
Transporte electrónico	10	5,21%	0,013308
Biosíntesis de ácidos grasos	4	2,08%	0,017418
Inducción de apoptosis	6	3,12%	0,01969
GENES REPRIMIDOS			
Categoría Funcional	Nº de genes	Porcentaje	Valor de p
Metabolismo lipídico	11	7,59%	0,02705
Señalización a través de receptores transmembrana tirosina quinasa	5	3,45%	0,02734
Catabolismo	11	7,59%	0,0285
Respuesta a estrés	16	11,03%	0,03535
Modificación de proteínas	21	14,48%	0,04391
Adhesión celular	11	7,59%	0,05
Clasificación por Localización Celular (GO:CC)			
GENES INDUCIDOS			
Categoría Funcional	Nº de genes	Porcentaje	Valor de p
Envuelta cornificada	4	2,08%	4,60E-05
Región extracelular	28	14,58%	5,26E-05
Membrana	66	34,38%	0,024627
GENES REPRIMIDOS			
Categoría Funcional	Nº de genes	Porcentaje	Valor de p
Región extracelular	19	13,10%	0,004926
Integral de membrana	42	28,97%	0,027201

Tabla 3. Estudio genético comparativo por *microarrays* en equivalentes de piel H-IKK α y H-Control.

4.1.7 IKK α aumenta la expresión de cadherina-E en tumores e induce un cambio en la variante histológica de los SCCs

Los resultados descritos hasta el momento indican que IKK α favorece la proliferación celular de queratinocitos en cultivos convencionales en monocapa. Por otra parte demuestran que, en condiciones de diferenciación, IKK α acelera la estratificación (aunque de forma desordenada) y permite que se complete la diferenciación terminal. Simultáneamente hemos comprobado que IKK α promueve la capacidad invasiva y proteolítica de matrices dérmicas (fibrina en nuestro caso). Estos datos nos llevaron a estudiar cuales serían las consecuencias del incremento de expresión de IKK α en células epidérmicas tumorales, ya que no se conoce mucho acerca del papel que juega IKK α en tumorigénesis y además existen ciertas controversias al respecto. Así, se ha descrito que puede actuar como supresor tumoral (Liu y cols., 2006) o inductor de la malignidad (Nakayama y cols., 2005) y capacidad metastásica (Luo y cols., 2007).

Se ha descrito que el nivel de expresión de IKK α disminuye en SCCs humanos a medida que aumenta el grado de malignidad tumoral (Liu y cols., 2006). Por otra parte, se sabe que existe una correlación inversa entre los niveles de expresión de cadherina-E y el grado de tumorigenicidad en líneas celulares epidérmicas de ratón (Navarro y cols., 1991; Cano y cols., 2000). Por tanto, nos planteamos estudiar la posible correlación entre los niveles de expresión de IKK α y cadherina-E en líneas celulares epidérmicas de distinto potencial tumorigénico. Observamos por *Western blot* que efectivamente esta correlación existe ya que la línea celular MCA3D (queratinocitos no tumorigénicos) tiene altos niveles de expresión de IKK α , mientras que la línea PDVC57 (moderadamente carcinogénica) presenta un importante descenso en los niveles de IKK α y prácticamente no se expresa en la línea HaCa-4, altamente tumorigénica (Figura 22-A). Los niveles de expresión de IKK α encontrados en estas líneas celulares de distinto potencial tumorigénico coinciden plenamente con los niveles de expresión de cadherina-E descritos para estas células (Navarro y cols., 1991; Cano y cols., 2000).

Para estudiar el efecto que tiene el incremento en los niveles de expresión de IKK α sobre el comportamiento neoplásico de células epidérmicas tumorigénicas, seleccionamos la línea celular de ratón PDVC57 ya que porta una mutación en el gen *Ha-ras*—se ha descrito que *Ha-ras* juega un papel fundamental en el desarrollo de SCCs humanos y que en ocasiones se encuentra mutado en estos tumores (Pierceall y cols., 1991)— y produce, al ser inyectada subcutáneamente en ratones inmunodeficientes, SCCs bien o moderadamente diferenciados que recuerdan a los que se originan en los ensayos de carcinogénesis química en piel de ratón en dos pasos (Casanova y cols., 2002). Para

realizar este estudio, transfectamos las células de manera estable con los vectores pRC- β Actin-3xHA-IKK α (C57-IKK α) o pcDNA3 (C57-Control). Comprobamos en primer lugar la expresión del transgén en las células C57-IKK α mediante la detección del epítipo HA por *Western blot* (figura 22-B). A continuación se analizó la expresión de IKK α y observamos un aumento en su expresión en las células C57-IKK α respecto a las células C57-Control. El análisis de expresión de cadherina-E, placoglobina y β -catenina en las células mostró un ligero aumento de cadherina-E y β -catenina y un incremento mayor de placoglobina en C57-IKK α (figura 22-B).

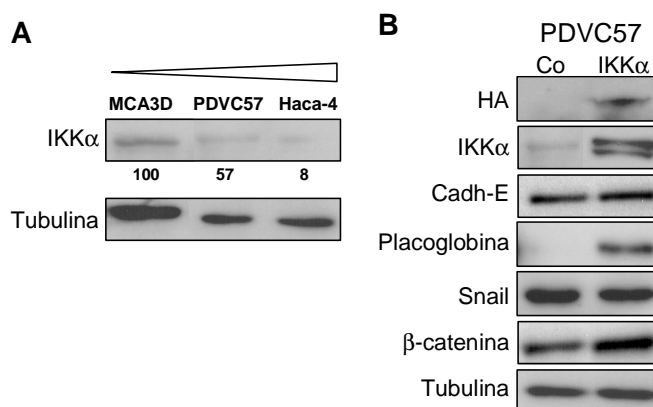


Figura 22. Estudio de la expresión de IKK α en las líneas celulares de ratón MCA3D, PDVC57 y Haca-4 y análisis del aumento de los niveles de cadherina-E, placoglobina y β -catenina en células C57-IKK α . (A) Análisis de la expresión de IKK α en líneas celulares con distinto potencial tumorigénico (MCA3D, PDVC57 y Haca-4) por *Western blot*. Se indica el nivel de expresión de IKK α en cada caso referido a su nivel de carga correspondiente, determinado con el anticuerpo anti-tubulina, y representado en unidades arbitrarias. (B) Análisis por *Western blot* de la expresión de las proteínas indicadas a partir de extractos totales de células C57-IKK α y C57-Control.

Para la realización de los ensayos de carcinogénesis en ratones inmunodeficientes, inyectamos subcutáneamente las células C57-IKK α y C57-Control en el lomo de distintos animales (ver apartado 3.21). El número total de tumores obtenidos fue de 12 para cada genotipo; se siguió diariamente la evolución de los mismos y a partir del día 7 post-inoculación y hasta el día 21 se midió su crecimiento. Los tumores desarrollados por las células C57-IKK α fueron de menor tamaño que los generados por las células C57-Control (figura 23-A). Analizamos la expresión de IKK α transgénica mediante la detección del epítipo HA por *Western blot*. Asimismo, comprobamos por *Western blot* e inmunohistoquímica que la expresión de IKK α en los tumores C57-IKK α estaba incrementada respecto a los controles (figuras 23-B y 26 A, B).

Analizamos el grado de proliferación de los tumores, medido como porcentaje de células que incorporan BrdU, y observamos menor tasa proliferativa en los tumores C57-IKK α respecto a los tumores C57-Control (figura 24-A). Por otro lado, el análisis de la apoptosis medida por ensayos de TUNEL indicó un mayor porcentaje de células apoptóticas en los tumores C57-IKK α . Estos dos hechos podrían ser los causantes del

menor tamaño de los tumores C57-IKK α respecto a los tumores control. Finalmente, estudiamos la angiogénesis de los tumores C57-IKK α y C57-Control mediante el análisis de la expresión de diferentes marcadores considerados pro y anti-angiogénicos por *Northern blot* y los resultados no mostraron diferencias en ambos tipos de tumores (figura 24-D).

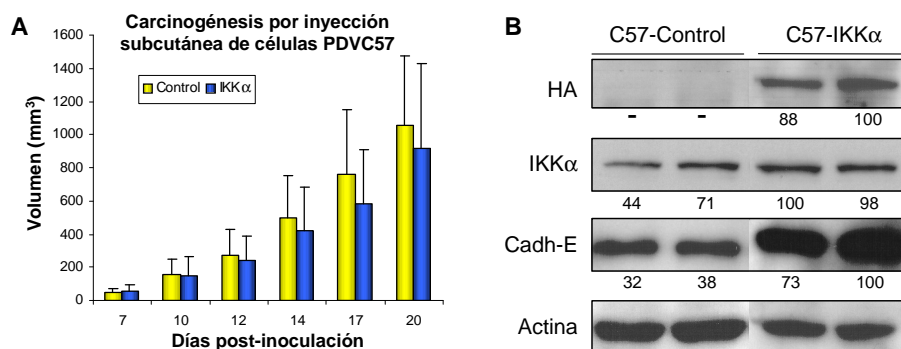


Figura 23. Carcinogénesis en ratones desnudos mediante inyección subcutánea de células PDVC57. (A) Representación gráfica de la cinética de crecimiento de tumores tras la inyección de células C57-IKK α y C57-Control. (B) Análisis de la expresión de las proteínas que se indican por *Western blot*, en extractos proteicos de tumores C57-IKK α y C57-Control. En cada caso, se indica el nivel de expresión de HA, IKK α y cadherina-E referido a su nivel de carga correspondiente, determinado con el anticuerpo anti-actina, y representado en unidades arbitrarias.

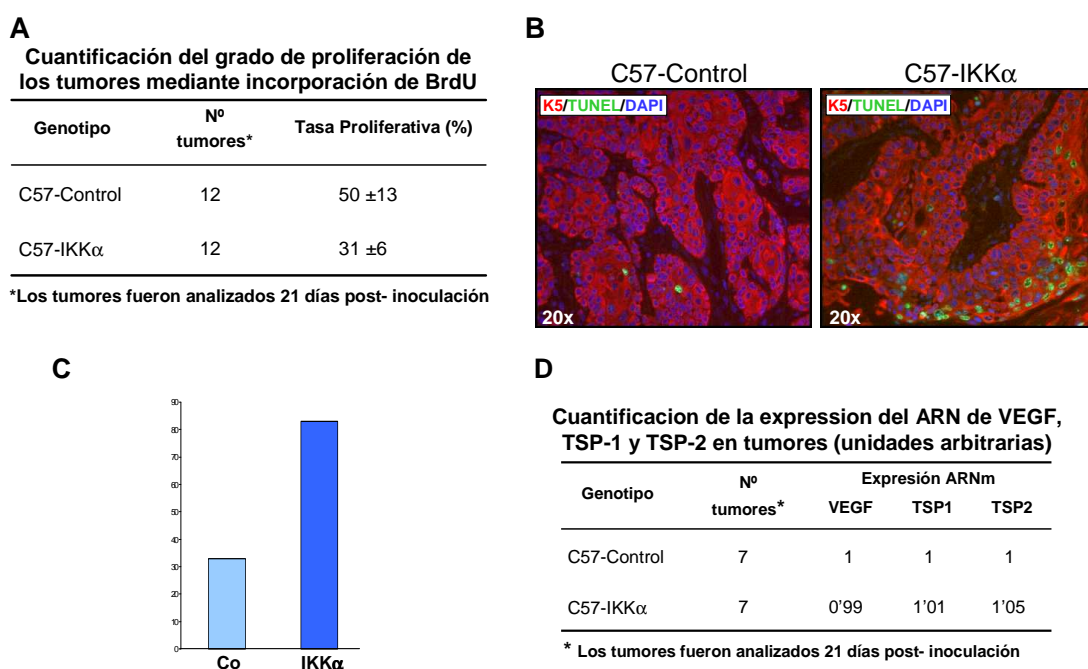


Figura 24. Disminución del grado de proliferación e incremento en el porcentaje de células apoptóticas en los tumores C57-IKK α . (A) Tabla esquemática en la que se indica la tasa proliferativa en los tumores C57-IKK α y C57-Control medida por la incorporación de BrdU ($p < 0.01$). (B) Ensayo de TUNEL (verde) y tinción por inmunofluorescencia de la expresión de la queratina K5 (rojo) en los tumores C57-IKK y control. Los núcleos de las células están teñidos con DAPI (azul). (C) Representación gráfica del valor promedio de tumores con más de 5 células apoptóticas de media por campo, medido en 10 campos diferentes para cada tumor C57-IKK α y C57-Control; $p < 0.05$. (D) Tabla esquemática en la que se indica la expresión de los marcadores angiogénicos VEGF, TSP1 y TSP2. TSP: trombospodina.

El análisis histopatológico reveló destacadas diferencias entre los tumores de ambos genotipos: mientras que los tumores C57-Control eran carcinomas epidermoides (carcinomas de células escamosas ó SCCs) moderadamente diferenciados (figura 25 A, B), los tumores originados a partir de las células C57-IKK α presentaban zonas de SCCs más diferenciadas, aunque poco numerosas, y extensas áreas de apariencia pseudoglandular (figura 25-C). Este tipo de tumor se asemeja a los tumores acantolíticos (ASCC) o pseudoglandulares humanos (Leboit y cols., 2006) (figura 25 G, H), en los cuales las células tumorales proliferan formando estructuras semejantes a glándulas o acinos (cavidades císticas intraepidérmicas) variables en tamaño que contienen en la luz células que se van desprendiendo (queratinocitos acantolíticos) (figura 25 D, F; cabezas de flecha negras). Además, en ellos es frecuente la aparición de células en anillo de sello (figura 25-D, triángulo), así como de estructuras tubulares o alveolares similares a apéndices pseudoglandulares (figura 25-E, asteriscos).

El análisis inmunohistoquímico de los tumores mostró un patrón de expresión de queratinas muy distinto entre C57-IKK α y C57-Control. Los tumores C57-Control presentaron escasa tinción de queratinas K1 ó K10 –marcadores característicos de tumores bien diferenciados–. Por el contrario, en los tumores C57-IKK α las áreas bien diferenciadas presentaron abundante tinción positiva para K1 y K10 (figura 26 C, D) mientras que las zonas con diferenciación pseudoglandular eran negativas para K1 y K10 (figura 26-D). La expresión de K13 –queratina de epitelios escamosos estratificados que se expresa en tumores pre-malignos de piel (Winter y cols., 1990)– era muy abundante en los tumores C57-IKK α , dando un patrón de tinción muy llamativo, principalmente en el epitelio que rodea las cavidades císticas y en el interior del lumen (figura 26-F). K13 fue detectado únicamente en pequeños focos de los tumores control (figura 26-E). La tinción inmunohistoquímica para IKK α en los tumores C57-IKK α mostró una expresión elevada tanto en las áreas bien diferenciadas del tumor como en las regiones ASCC (figura 26-B; nótese la tinción de IKK α en los acantocitos, cabezas de flecha negra). Sin embargo, la tinción contra IKK α en los tumores C57-Control mostró una baja expresión de IKK α .

El análisis de la expresión de cadherina-E por *Western blot* e inmunohistoquímica reveló bajos niveles de esta proteína en los tumores C57-Control, de acuerdo con lo descrito previamente para SCCs moderadamente diferenciados (Navarro y cols., 1991) (figuras 23B y 26-G). Sin embargo, los tumores C57-IKK α mostraron altos niveles de expresión de cadherina-E tanto en las zonas SCC bien diferenciados como en las áreas ASCC de diferenciación pseudoglandular (figuras 23-B y 26-H). Es de destacar la presencia de tinción citosólica de cadherina-E en las áreas acantolíticas con

queratinocitos discohesivos en vez de la tinción en membrana celular observada en las regiones SCC de ambos tipos tumorales, C57-Control y C57-IKK α (figura 26 G, H).

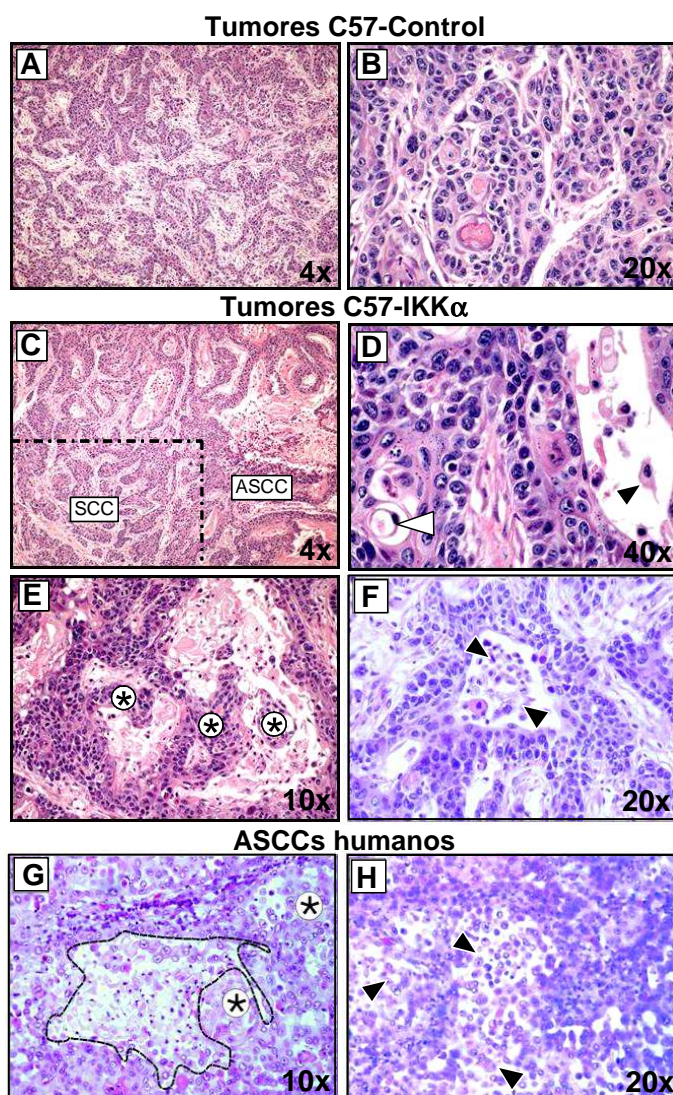


Figura 25. Análisis histológico de tumores C57-Control y C57-IKK α . Tinción H/E mostrando un fenotipo SCC moderadamente diferenciado en los tumores C57-Control (A, B), un fenotipo mixto con áreas de SCC y ASCC en los tumores C57-IKK α (C-F) y muestras de ASCC humanos (G-H). Se puede observar en los tumores C57-IKK α la aparición de invaginaciones en las cavidades formando estructuras pseudoglandulares de tamaño variable (E, asteriscos), así como células acantolíticas (D, F; cabezas de flecha negras).

El análisis de los tumores originados a partir de la inyección de células C57-Control y C57-IKK α en ratones inmunodeficientes nos muestra que la expresión de niveles elevados de IKK α induce un cambio en la variante histológica de los SCCs resultantes, dando lugar a tumores que se asemejan a los ASCC humanos. Estos tumores –junto con los SCCs indiferenciados– son considerados de mal pronóstico y elevado riesgo de metastatizar, aunque a pesar de ello están poco caracterizados (Johnson y Helwig, 1966; Nappi y cols., 1989). Hemos encontrado características que distinguen a

los ASCCs del resto de tumores descritos hasta el momento, como son una elevada expresión de IKK α y cadherina-E en ausencia de las queratinas K1 y K10. Este hallazgo es importante, ya que hasta ahora siempre se asumía que la expresión de cadherina-E iba en paralelo con la de las queratinas K1 y K10 y que su elevada expresión era inherente a un mejor pronóstico de los tumores. También se había publicado que los tumores más diferenciados, y por tanto más benignos, expresaban mayores niveles de IKK α . Nuestros resultados muestran por primera vez que puede haber tumores de alto riesgo, como son los ASCCs, con alta expresión de IKK α y de cadherina-E.

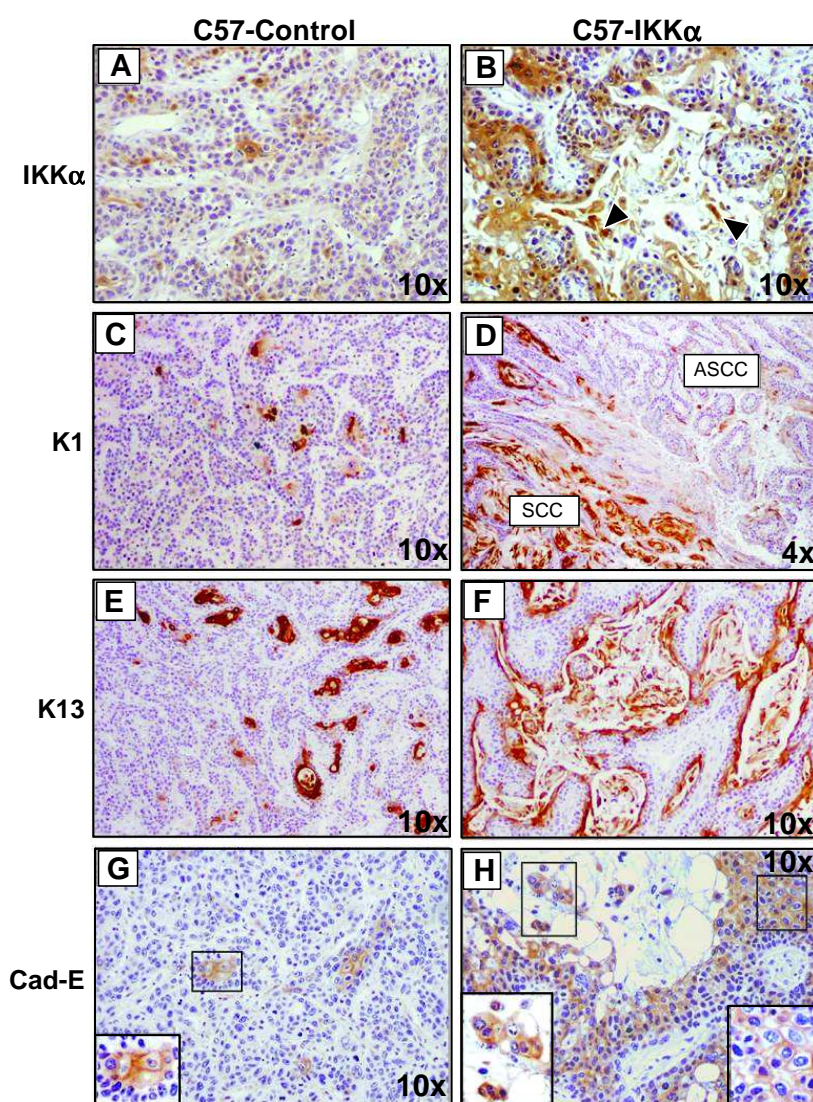


Figura 26. Análisis inmunohistoquímico de tumores C57-Control y C57-IKK α . Análisis de la expresión de las proteínas IKK α (A, B), K1 (C, D), K13 (E, F) y cadherina-E (G, H) mediante tinción inmunohistoquímica en cortes histológicos de los tumores C57-Control y C57-IKK α . (G, H) Los insertos muestran zonas aumentadas donde se aprecia el tipo de expresión de cadherina-E en las regiones SCC y ASCC de los tumores C57-Control y C57-IKK α respectivamente. En el caso de las regiones ASCC se observa una tinción preferentemente citosólica (H, aumento de la parte izquierda), mientras que en las regiones de SCC la tinción de cadherina-E se encuentra en las zonas de adhesión intercelular (G, H-parte derecha de la figura).

4.1.8 Los tumores C57-IKK α murinos se asemejan a los ASCCs humanos

A continuación nos propusimos investigar si los SCCs acantolíticos o pseudoglandulares (ASCCs) humanos presentan las mismas características que los análogos C57-IKK α murinos descritos en esta memoria. Para ello realizamos un análisis inmunohistoquímico de la expresión de IKK α , cadherina-E y de las queratinas K1 y K10 en ASCCs de origen humano. El resultado mostró que los tumores ASCCs humanos también presentan el mismo patrón de expresión de estas proteínas: mostraron una elevada expresión de IKK α (figura 27-C); cadherina-E se expresaba extensamente y la señal era principalmente citosólica, en concordancia con el patrón de expresión previamente descrito para las regiones ASCC de los tumores C57-IKK α murinos (figura 27-F); no detectamos expresión de K1 ni de K10, excepto en un foco de SCC convencional presente en el tumor ASCC (figura 27-I). Posteriormente, analizamos los niveles de expresión de estas proteínas en SCCs humanos de distinto grado de diferenciación y comprobamos que IKK α , cadherina-E y las queratinas K1 y K10 se expresan en estos tumores de forma proporcional entre ellas e inversamente proporcional al grado de diferenciación del tumor, de manera que la expresión de las tres proteínas es elevada en los tumores bien diferenciados y casi no se detecta en los indiferenciados (Batlle y cols., 2000; Cano y cols., 2000; Liu y cols., 2006) (figura 27 A-B, D-E, G-H).

Estos datos indican que, en el caso de los tumores humanos, aunque tanto los SCCs indiferenciados como los ASCCs se consideran agresivos y con alta capacidad de metastatizar, difieren completamente en cuanto a sus niveles de expresión de IKK α y de cadherina-E. Como los tumores SCCs indiferenciados no expresan IKK α , se había sugerido un papel para IKK α como supresor de la progresión y metástasis tumoral (Liu y cols., 2006). Sin embargo, nuestros resultados establecen una elevada expresión de IKK α en tumores agresivos humanos (ASCCs), sugiriendo un nuevo papel para IKK α en la génesis de los tumores de piel.

En resumen, nuestros resultados muestran que la expresión elevada de IKK α en queratinocitos tumorales de ratón altera la diferenciación de los tumores resultantes, induciendo el desarrollo de una variante histológica acantolítica (ASCC). Como los ASCCs humanos muestran unas características similares a los murinos (en los que únicamente hemos sobreexpresado IKK α), nuestros resultados sugieren que el incremento en la expresión de IKK α es responsable de la aparición de esta variante histológica de SCC en humanos.

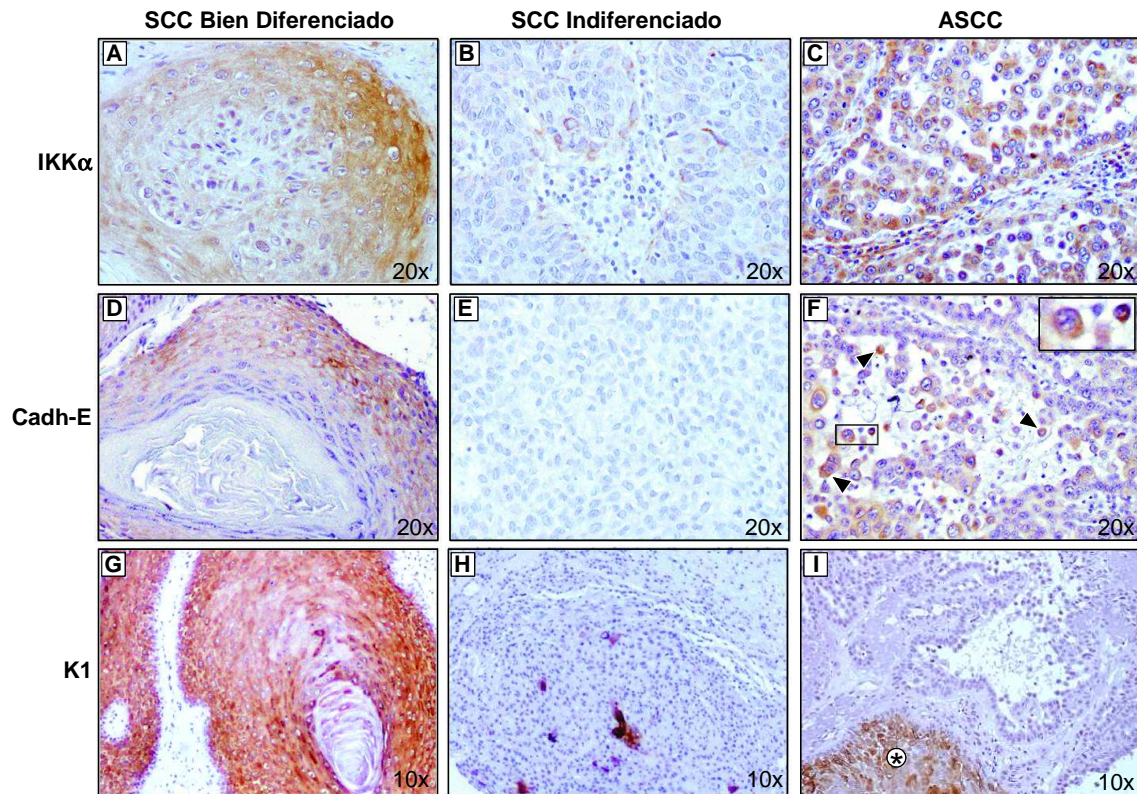


Figura 27. Análisis inmunohistoquímico de SCCs humanos con distinto grado de diferenciación y ASCCs. (A-I) Análisis de la expresión de las proteínas IKK α (A-C), cadherina-E (D-F) y K1 (G-I) mediante tinción inmunohistoquímica en cortes histológicos de tumores humanos (SCCs de distinto grado de diferenciación y ASCCs). Los triángulos (F) indican tinción preferentemente citosólica de cadherina-E en los queratinocitos acantolíticos. El asterisco (I) muestra tinción positiva para K1 en un foco de SCC que se encuentra en el tumor ASCC.

4.2 Estudio mediante ratones transgénicos del papel de IKK α en la morfogénesis y tumorigénesis cutánea

Para el estudio del papel de la subunidad IKK α en la morfogénesis y tumorigénesis epidérmica también hemos empleado ratones transgénicos con niveles alterados de la proteína IKK α , tanto por incremento de sus niveles de expresión en piel como por su inhibición mediante el uso de ARNs interferentes. Estos dos modelos animales nos van a permitir ampliar los estudios anteriormente expuestos en el contexto de organismos completos.

4.2.1 Ratones transgénicos K5-IKK α

4.2.1.1 Generación de líneas de ratones K5-IKK α

Microinyectamos embriones de ratón de una célula con la construcción K5-IKK α (en la que la expresión de IKK α está dirigida por elementos reguladores de la queratina K5, que dirige la expresión a piel y otros epitelios estratificados; ver apartados 3.1 y 3.14.1 de Materiales y Métodos) y se transfirieron a un total de 16 hembras, de las que nacieron 157 animales. La identificación de los ratones transgénicos se llevó a cabo mediante análisis por *Southern blot* del ADN genómico extraído de biopsias de cola de estos animales. El patrón de bandas obtenido al digerir con el enzima EcoRI mostró la presencia de las bandas de 1.2, 1.8 y 4.8 Kpb, tal y como se esperaba considerando las dianas EcoRI que existen en la construcción K5-IKK α (figura 28). Se obtuvieron 9 ratones transgénicos fundadores, 6% del total (identificados como K5-IKK α -1 a K5-IKK α -9), portadores de diferente número de copias del transgén; estos animales se cruzaron con ratones B6D2F1 con la finalidad de establecer líneas transgénicas. Las hembras K5-IKK α -2 y K5-IKK α -9 fueron las únicas que no transmitieron el transgén, por lo que no se pudieron utilizar para los siguientes análisis.

En ninguna de las líneas obtenidas se observaron alteraciones fenotípicas que distinguieran los ratones transgénicos de sus hermanos no transgénicos. Además, el análisis histológico de la piel de lomo no puso de manifiesto anomalías en los transgénicos K5-IKK α (no mostrado).

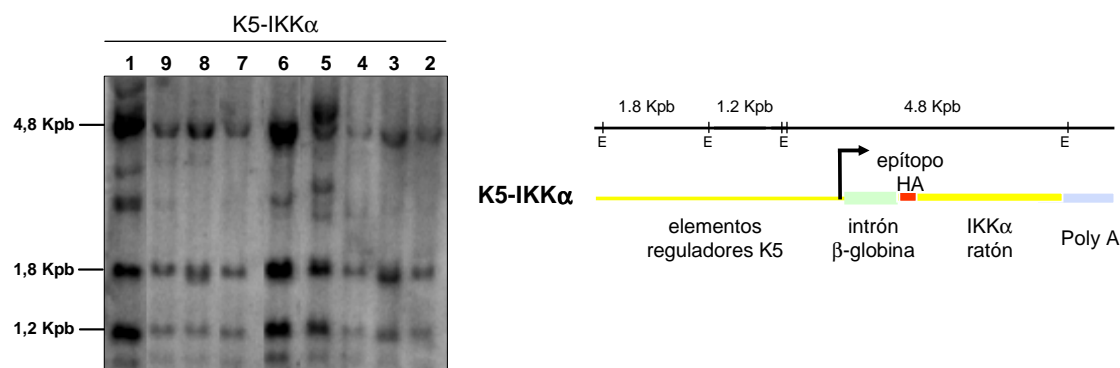


Figura 28. Identificación de los ratones transgénicos fundadores K5-IKKα mediante *Southern blot*. Se incluye un esquema representativo de la construcción K5-IKKα y del patrón de bandas que se obtiene tras la digestión con el enzima EcoRI.

4.2.1.2 Análisis de la expresión de la proteína IKKα en ratones K5-IKKα

Analizamos el nivel de expresión de IKKα mediante ensayos de *Western blot* de extractos proteicos de piel de lomo en animales de las 7 líneas transgénicas obtenidas. Se comparó su nivel de expresión con el obtenido para sus hermanos no transgénicos. Se utilizó un anticuerpo específico contra IKKα que detecta tanto la forma transgénica (que lleva unidos tres epítopos HA en su extremo N-terminal) como la forma endógena, siendo posible observar en el *Western blot* original la presencia de dos bandas debido a la diferencia de tamaño entre ambas formas (en el extracto proteico del animal de la línea K5-IKKα-6 que se muestra en la figura 29 es perceptible esta doble banda). Además, se utilizó un anticuerpo específico contra el epítipo HA, que detecta tan sólo la proteína transgénica. Comprobamos con ambos anticuerpos que todas las líneas analizadas expresaban el transgén (figura 29). Las líneas K5-IKKα-1 y K5-IKKα-3 fueron las de mayor expresión, aunque el incremento en la expresión respecto al gen endógeno fue tan solo entre 2 y 3 veces. Como control de carga se utilizó un anticuerpo específico contra actina.

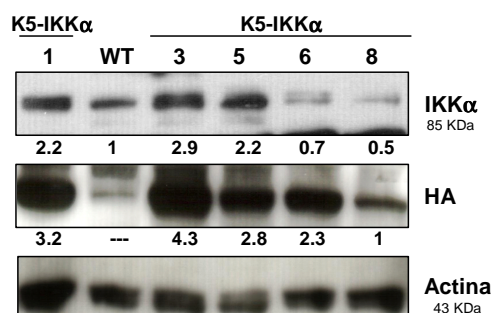


Figura 29. Análisis de la expresión del transgén IKKα por *Western blot* de las líneas hemigotas K5-IKKα. Los niveles de expresión de IKKα en las líneas K5-IKKα-4 y 7 (no mostradas en la figura) fueron similares a los obtenidos en K5-IKKα-6 y 8. En cada caso se indica el nivel de expresión de IKKα y HA referido a su nivel de carga correspondiente, determinado con el anticuerpo anti-actina, y representado en unidades arbitrarias.

4.2.1.3 Análisis del nivel de ARN mensajero en K5-IKK α

Se analizaron los niveles de expresión de *Ikk α* por *Northern blot* a partir de ARN total de piel de lomo de animales K5-IKK α . La hibridación con una sonda específica para IKK α detecta tanto el ARNm transgénico como el endógeno, siendo ambos distinguibles por su distinto tamaño (figura 30). La línea K5-IKK α -1 fue la de mayor expresión de IKK α transgénica; sin embargo, se observó en ella una disminución notable del correspondiente ARNm endógeno, al igual que en las líneas K5-IKK α -4, 6 y 7.

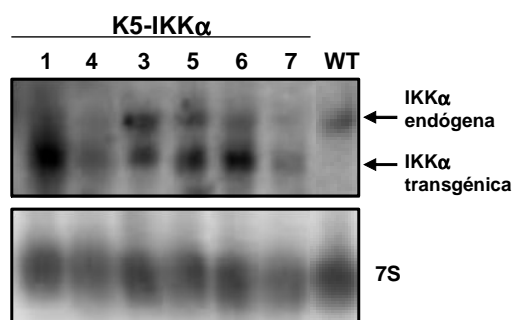


Figura 30. Análisis por *Northern blot* del nivel de ARN mensajero del gen *Ikk α* en ratones transgénicos hemicigotos K5-IKK α . Se aprecian dos bandas correspondientes a IKK α transgénica y endógena. Como control de carga se utilizó la sonda del 7S.

Con idea de conseguir una mayor expresión de IKK α , intentamos obtener animales homocigotos para el transgén en aquellas líneas con mayores niveles de expresión, a juzgar por las señales obtenidas en los experimentos reflejados en las figuras 29 y 30, mediante cruces entre machos y hembras hemicigotos (líneas K5-IKK α -1 y 3). Para detectar los animales homocigotos utilizamos PCR cuantitativa en tiempo real, con objeto de discriminar estos animales (que tienen el doble de copias del transgén) de los hemicigotos. Los ratones considerados homocigotos por PCR se cruzaron posteriormente con ratones no transgénicos para comprobar su genotipo (en el caso de que fueran en verdad homocigotos, todas sus crías deberían ser transgénicas K5-IKK α). Obtuvimos de esta manera 3 homocigotos para la línea K5-IKK α -3 y ninguno para la línea K5-IKK α -1 (figura 31-A), lo que contrasta con lo esperado *a priori*. Al estudiar los niveles de ARNm de *Ikk α* en animales homocigotos de la línea K5-IKK α -3 por *Northern blot* en piel, observamos que los niveles de expresión de IKK α no variaban respecto a los niveles observados en los animales transgénicos heterocigotos (figura 31 B, C). Estos datos sugieren que la expresión de IKK α está regulada de forma estricta, de manera que la presencia de ARNm derivado del transgén provoque una disminución en el nivel estacionario de ARNm correspondiente al gen endógeno, siendo relativamente limitado el incremento que se puede conseguir del ARNm o de la proteína en animales transgénicos.

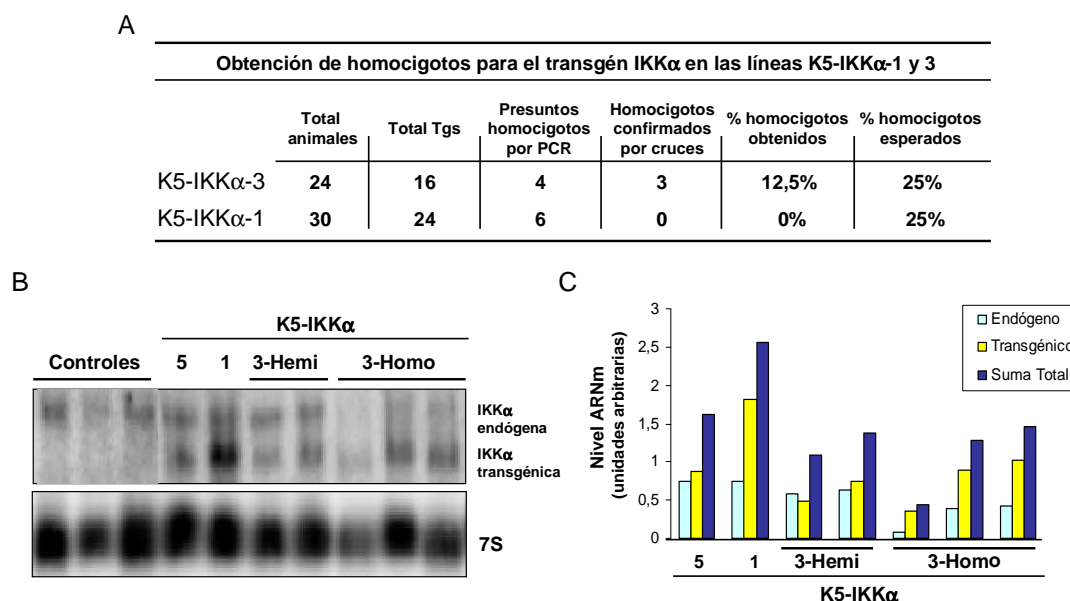


Figura 31. La obtención de animales homocigotos para el transgén IKK α no aumenta los niveles de ARNm respecto a los animales hemocigotos. (A) Tabla esquemática donde se indica el número de animales analizados mediante RT-qPCR para la obtención de transgénicos homocigotos en las líneas K5-IKK α -1 y 3. (B) Análisis del nivel de ARNm de IKK α por *Northern blot* en animales control, líneas K5-IKK α -5, K5-IKK α -1 y animales homocigotos y hemocigotos de la línea K5-IKK α -3. (C) Representación gráfica de la cuantificación de las bandas correspondientes a IKK α transgénica y endógena respecto al control de carga 7S. Además, se incluye la suma total de ambas bandas para representar el nivel total de expresión de IKK α en los transgénicos K5-IKK α .

4.2.1.4 Expresión de miembros de la vía de NF- κ B

A continuación analizamos por *Western blot* los niveles de expresión de otras subunidades del complejo IKK y de proteínas importantes en la vía de señalización de NF- κ B, en extractos de piel de lomo de diferentes líneas de ratones K5-IKK α (figura 32). Los resultados indicaron que los niveles de IKK β e IKK γ no se alteraban de forma detectable por el incremento en la expresión de IKK α . Del mismo modo no se observaron cambios significativos en los niveles de p50, de p105 ni de p65 fosforilado (p65-P). Por tanto, la expresión incrementada de IKK α no parece alterar los niveles de expresión de los demás miembros de la vía canónica de activación de NF- κ B. Al obtener el mismo resultado en las 3 líneas de ratones analizadas, escogimos la línea K5-IKK α -1 –en la que se alcanzó una expresión más elevada de IKK α (figura 31)– para realizar sobre ella estudios de carcinogénesis, tal y como se muestra a continuación.

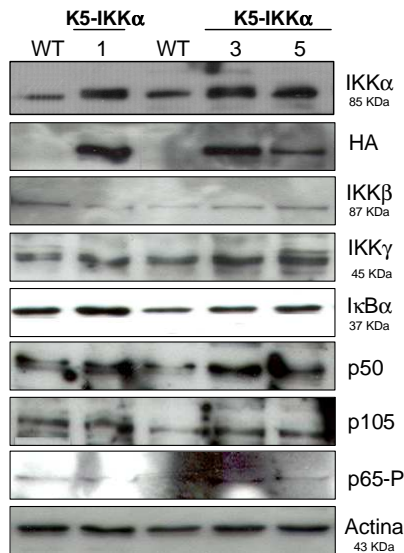


Figura 32. El incremento en la expresión de IKKα en piel no parece alterar otros miembros de la vía de activación de NF-κB. Análisis por *Western blot* de la expresión del complejo IKK (IKKα, IKKβ e IKKγ), el represor IκBα y los miembros de la familia NF-κB: p50/p105 y p65 fosforilado. Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-actina

4.2.1.5 Tumorigénesis de piel en los ratones K5-IKKα

Realizamos ensayos de carcinogénesis química en piel de ratones de la línea K5-IKKα-1 y en sus hermanos no portadores del transgén K5-IKKα (controles) mediante dos aproximaciones diferentes: carcinogénesis química en dos etapas y carcinogénesis en el fondo génico Tg.AC. La primera de ellas requiere la administración tópica de un carcinógeno (DMBA) seguido de aplicaciones sucesivas del promotor tumoral TPA (durante 12 semanas), mientras que la otra aproximación requiere el cruce de animales K5-IKKα con animales transgénicos Tg.AC para obtener animales portadores de los transgenes K5-IKKα y Tg.AC, así como la población control portadora sólo del transgén Tg.AC. Los animales Tg.AC expresan en piel el oncogén *Ha-ras* activado, por lo que no precisan el paso de iniciación con el carcinógeno DMBA, tan sólo la aplicación de TPA.

En el experimento de carcinogénesis química en dos etapas, los animales K5-IKKα y control mostraron un comportamiento muy similar en relación al número de animales que desarrollaron algún papiloma (el 50% de ratones tratados), el tamaño de los tumores y el número de tumores por animal (figura 33-A). Sin embargo, destacó un retraso de aproximadamente 3 semanas en la aparición de los papilomas en los ratones K5-IKKα respecto a los controles, como se observa en la figura 33-A, aunque, por otra parte, también hubo un retraso equivalente en el tiempo de regresión de los papilomas. Respecto a la carcinogénesis en el fondo génico Tg.AC, los papilomas comenzaron a desarrollarse en ambos genotipos en la séptima semana después de la primera aplicación de TPA y en la semana 14 ó 15 comenzaron a involucionar. Al igual que en la carcinogénesis DMBA/TPA, en los tumores K5-IKKα en fondo génico Tg.AC la regresión tumoral fue también más lenta, manteniéndose más en el tiempo (figura 33-B).

Se comprobó por *Western blot* la expresión del transgén en los tumores K5-IKK α y control de ambos ensayos mediante la detección del epítipo HA. También se confirmó por *Western blot* el incremento de la expresión de IKK α total en los tumores K5-IKK α respecto a los controles (figura 33-C).

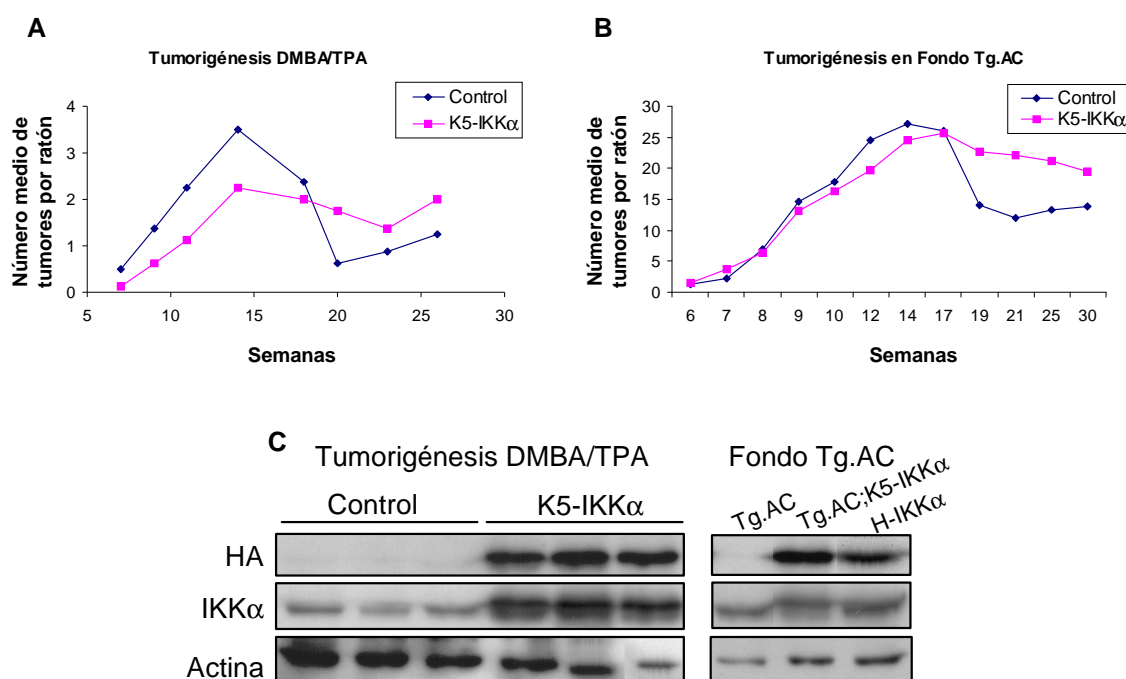


Figura 33. Carcinogénesis química en ratones transgénicos K5-IKK α . (A, B) Representación gráfica de la cinética de aparición de los tumores en animales K5-IKK α y control a partir de los ensayos de carcinogénesis química en dos pasos DMBA/TPA (A) y de carcinogénesis en fondo génico Tg.AC (B). (C) Análisis mediante *Western blot* de la expresión del epítipo HA y de IKK α en extractos proteicos de tumores obtenidos de animales K5-IKK α y control en los diferentes ensayos de carcinogénesis química. Como control positivo para la expresión de IKK α y HA se utilizó un extracto procedente de las células H-IKK α . Como control de carga se utilizó un anticuerpo anti-actina.

El análisis histológico de los tumores obtenidos en el ensayo de carcinogénesis química DMBA/TPA reveló que los tumores desarrollados por los animales control eran lesiones benignas de arquitectura papilomatosa (figura 34 A, B). Sin embargo, los tumores desarrollados por los animales K5-IKK α presentaban regiones con displasia severa, caracterizada por una desorganización de la estructura espacial del epitelio (figura 34 D, E; insertos), en contraste con el epitelio organizado que se observaba en los tumores control (figura 34-B, inserto); desde el punto de vista histopatológico, esta displasia implica un peor pronóstico del tumor. En cuanto a los tumores procedentes del ensayo de carcinogénesis en fondo génico Tg.AC, el análisis histológico mostró que los animales control desarrollaban lesiones benignas (figura 34 F, G). Por el contrario, los tumores que se generaban en los ratones K5-IKK α consistían en microcarcinomas invasivos con nidos infiltrantes, que suponen un signo de malignidad (figura 34 I, J).

Se observó que en ambos ensayos de carcinogénesis, tanto en los ratones K5-IKK α como en los controles, aparecieron lesiones con patrones de crecimiento papilomatoso (tumor exofítico, que crece hacia el exterior; ejemplo figura 34-A) y de tipo queratoacantoma (tumor con crecimiento en forma de cráter, invaginado; ejemplo figura 34-C), aunque el tener un tipo de crecimiento u otro no repercute en el grado de agresividad del tumor. Se realizaron análisis inmunohistoquímicos de la expresión de las queratinas K5, K1, K10 y K13 y no se observaron diferencias llamativas (no mostrado).

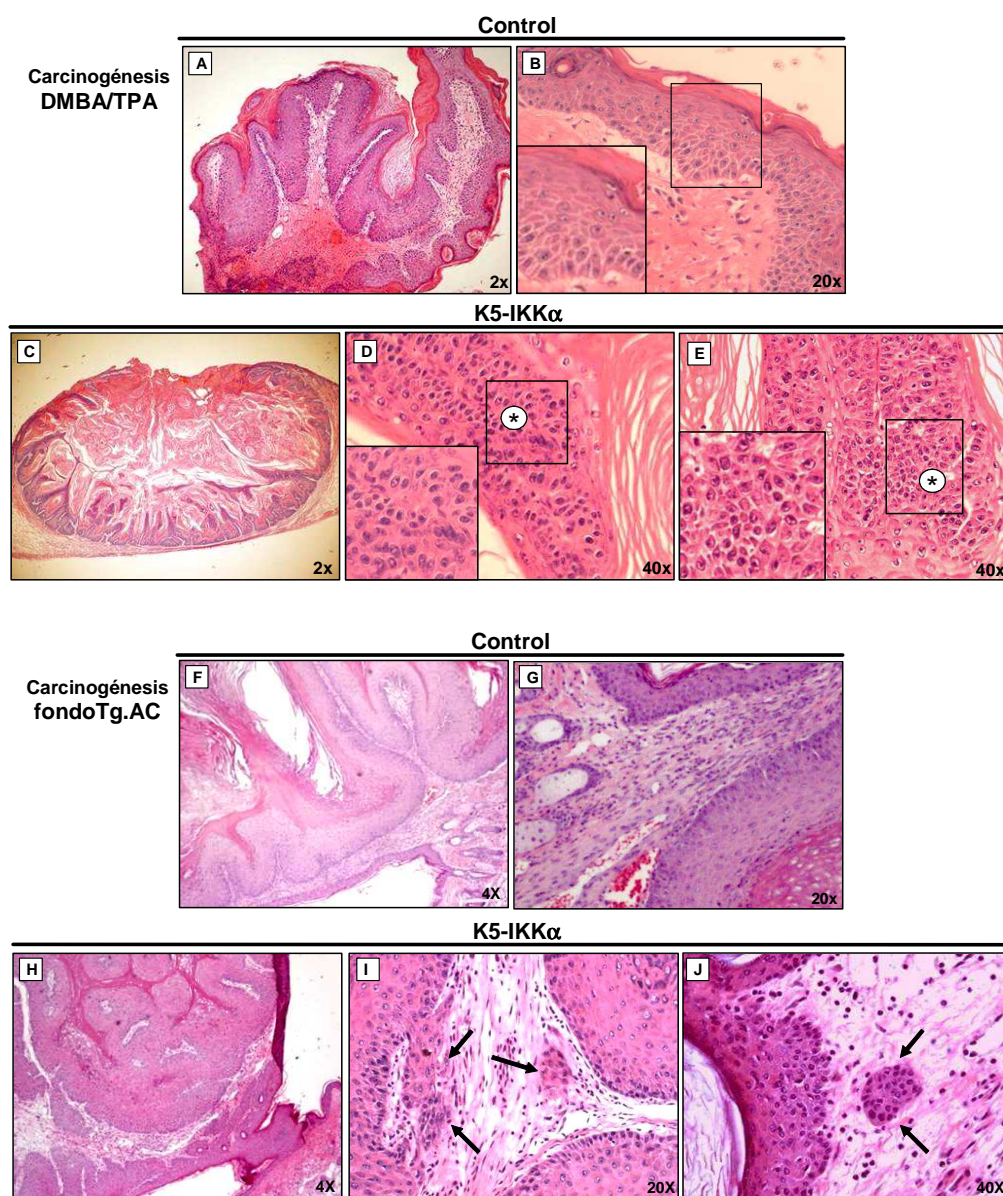


Figura 34. Análisis histológico de los tumores obtenidos en animales K5-IKK α y control a partir de los ensayos de carcinogénesis química DMBA/TPA y en el fondo génico Tg.AC. Tinción H/E de los tumores originados en animales K5-IKK α y control a partir de los ensayos de carcinogénesis química DMBA/TPA (A-E) y en el fondo génico Tg.AC (F-J). Se muestra la displasia presente en los tumores de ratones K5-IKK α originados en el ensayo de carcinogénesis DMBA/TPA (caracterizada por una desorganización de la estructura espacial del epitelio) (D, E; asteriscos y ampliaciones), así como los microcarcinomas invasivos (nidos infiltrantes) presentes en los tumores de ratones K5-IKK α originados en el ensayo de carcinogénesis en fondo Tg.AC (I, J; flechas).

Por tanto, nuestros datos muestran que el incremento en los niveles de expresión de IKK α induce cambios preneoplásicos en los tumores desarrollados en los experimentos de carcinogénesis química *in vivo*. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en los equivalentes de piel, en los que observamos la tendencia a la invasión de las células H-IKK α (comparable a los nidos invasivos de la carcinogénesis Tg.AC) y su estratificación caótica (identificable con la displasia de los papilomas IKK α en la carcinogénesis DMBA/TPA). Asimismo, estos resultados concuerdan también con los obtenidos en experimentos de carcinogénesis con células C57-IKK α en ratones inmunodeficientes, en los cuales la expresión elevada de IKK α inducía una variante histológica de SCC más agresiva que los SCCs convencionales a los que daban lugar las células C57-Control. En la carcinogénesis de los ratones K5-IKK α , éstos dan lugar a tumores premalignos (papilomas displásicos) o malignos (microcarcinomas) en vez de las lesiones benignas que se originan en los ratones control en el periodo de tiempo analizado.

4.2.2 Inhibición de la expresión de IKK α por interferencia de ARN en ratón: ratones *knockdown* para IKK α

Los animales carentes de la subunidad IKK α mueren perinatalmente, lo que imposibilita el estudio detallado de la función de esta proteína en procesos como la diferenciación terminal o la tumorigénesis en piel de estos animales. Por ello, nos planteamos desarrollar un nuevo modelo experimental que tuviera disminuida la expresión de la subunidad IKK α , mediante el uso de técnicas de interferencia de ARN, y estudiar el posible efecto de la inhibición parcial de su expresión sobre el desarrollo y diferenciación epidérmica de estos animales.

4.2.2.1 Análisis del funcionamiento de siRNAs contra IKK α de ratón

El plásmido pSUPER está diseñado para la expresión de pequeños ARNs de doble cadena conocidos como siRNAs. Estos siRNAs pueden producir una disminución en la expresión génica de forma eficiente y específica (Elbashir y cols., 2001). El vector pSUPER utiliza el promotor H1 para la producción de siRNAs, siendo su transcripción dependiente de la ARN Polimerasa III. Se considera que la expresión del promotor H1 es ubicua; este promotor dirige la expresión de un ARN de pequeño tamaño denominado H1-RNA que forma parte de la endorribonucleasa P (RNasaP) y que está implicado en el procesamiento de precursores de ARNs transferentes para la formación de su estructura madura (Mann y cols., 2003).

Utilizamos los programas informáticos en red proporcionados por Oligoengine (<http://www.oligoengine.com/>) y Clontech (<http://www.clontech.com/>) para el diseño de siRNAs y seleccionamos las secuencias indicadas en el apartado 3.1 de Materiales y Métodos como las más adecuadas para abordar una estrategia de inhibición de la expresión de IKK α por interferencia de ARN mediante el vector pSUPER. Así, generamos los plásmidos SUPER-1, SUPER-2 y SUPER-Control, de manera que los siRNAs expresados por SUPER-1 y SUPER-2 son complementarios a distintas secuencias del ARN mensajero del gen *Ikk α* , mientras que el expresado por SUPER-Control no es complementario a ninguna secuencia conocida en ratón; también se usó como control el vector pSUPER sin contener ninguna secuencia para la expresión de siRNAs, al que hemos denominado pSUPER-vacío. La comprobación de la eficacia de estas construcciones se hizo mediante cotransfecciones transitorias e independientes, en la línea celular HEK-293T, de los vectores de interferencia junto con el plásmido pRC- β Actin-3xHA-IKK α (que codifica para la proteína IKK α unida a tres copias del epítipo HA). Se analizó por *Northern* y *Western blot* el nivel de expresión de IKK α en las células transfectadas con las distintas construcciones (Figura 35). Observamos que la expresión de IKK α disminuía cuando se transfectaba SUPER-1 o SUPER-2, en comparación con los niveles de IKK α cuando se transfectó SUPER-Control o pSUPER-vacío. Además, se observó que los siRNAs expresados por SUPER-1 interferían con mayor eficiencia que los expresados por SUPER-2 y que la inhibición era más intensa cuando se aumentaba la cantidad relativa de plásmido de interferencia (con una relación entre pRC- β Actin-3xHA-IKK α y pSUPER de 1:2 la expresión de IKK α es menor que cuando la relación es 1:0.5). Considerando todos estos resultados, seleccionamos el siRNA expresado por SUPER-1 para inhibir la expresión de IKK α en un modelo transgénico.

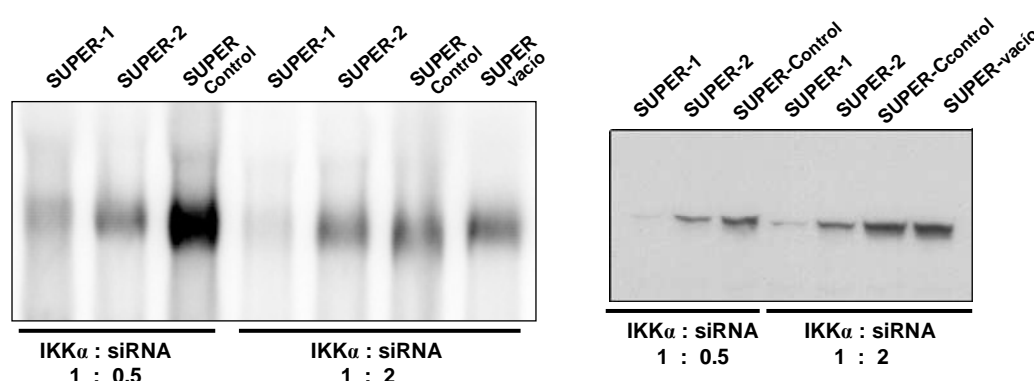


Figura 35. Comprobación de la funcionalidad de las construcciones de interferencia para disminuir la expresión de IKK α . Cotransfección de vectores SUPER-1, SUPER-2, SUPER-Control y pSUPER-vacío con el plásmido pRC- β Actin-3xHA-IKK α y análisis de la expresión de IKK α por *Northern blot* (imagen izquierda) y *Western blot* (imagen derecha). Debajo de los *blots* se indica la relación molar entre los plásmidos usados: 1:0.5 ó 1:2 (pRC- β Actin-3xHA-IKK α : pSUPER, respectivamente).

4.2.2.2 Generación de ratones transgénicos SUPER-1

Utilizamos los fragmentos A y B, obtenidos a partir de la construcción SUPER-1 para la expresión de un siRNA específico de IKK α (siRNA-IKK α 1), con tamaños de unos 300 pb y 3000 pb respectivamente (ver apartados 3.1 y 3.14.2 de Materiales y Métodos). Ambos fragmentos fueron microinyectados, en distintos experimentos, en embriones de ratón de una célula para la obtención de ratones transgénicos. El fragmento A contiene exclusivamente los elementos funcionales necesarios para la síntesis del siRNA: el promotor H1 y el oligonucleótido de 64 nt siRNA-IKK α 1. Debido al pequeño tamaño de este fragmento de ADN, desconocíamos si la transcripción podría estar afectada por la integración en tándem de múltiples copias o si éstas serían sensibles a efectos de posición. Por ello, también nos planteamos la inyección del fragmento B, que corresponde al plásmido completo SUPER-1 linearizado (unos 3000 pb). Sin embargo, este fragmento contiene secuencias plasmídicas y desconocemos si podrían inhibir la expresión de construcciones dirigidas por promotores transcritos por la ARN Pol III (como el H1), al igual que se ha descrito para la expresión de transgenes que contienen promotores transcritos por la ARN Pol II (Palmiter y Brinster, 1986).

En los experimentos de microinyección pronuclear se transfirieron embriones inyectados con el fragmento A a 10 hembras y embriones inyectados con el fragmento B a 9 hembras. Se obtuvieron un total de 148 animales (99 de A y 49 de B). La identificación de ratones transgénicos se llevó a cabo mediante análisis por *Southern blot* de ADN genómico extraído de biopsias de cola. En este caso, digerimos con enzimas de restricción que no cortan el ADN microinyectado, de manera que en cada muestra transgénica se obtienen bandas de diferente tamaño, como consecuencia de la diferente distribución de sitios de restricción en el entorno de las copias integradas del transgén. La diferente intensidad de las bandas es reflejo del distinto número de copias integradas del transgén (figura 36). Se obtuvieron 9 ratones transgénicos fundadores (6% del total), 6 para el fragmento A (SUPER-1A) y 3 para el fragmento B (SUPER-1B). Aunque no se cuantificó el número de copias, sí que se pudo observar que los transgénicos SUPER-1B tenían más copias integradas que los SUPER-1A. Con objeto de derivar líneas transgénicas, los fundadores se cruzaron con ratones B6D2F1. El análisis de los animales transgénicos en la amplificación de cada una de las líneas se realizó por PCR. Los animales SUPER-1A-4 y A-5 fueron los únicos para los que no se consiguió transmisión del transgén.

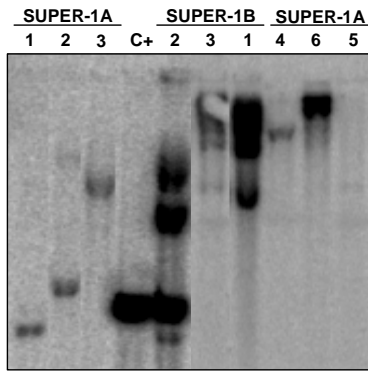


Figura 36. Identificación de los ratones transgénicos fundadores SUPER-1 mediante *Southern blot*. Se indica el fragmento inyectado (A o B), así como el número asignado a cada una de las líneas. Como control positivo (C+) se usó 100 pg de plásmido SUPER-1A mezclado con ADN de ratón (10 µg) no transgénico.

4.2.2.3 Análisis de la expresión de siRNAs en los transgénicos SUPER-1

Una vez establecidas las líneas transgénicas, se comprobó en primer lugar la presencia de siRNAs específicos para el gen *Ikkα* mediante *Northern blot*. Se aisló ARN total de diferentes tejidos de las 7 líneas obtenidas y se utilizaron geles de poliacrilamida para separarlos debido a que el pequeño tamaño de los siRNAs (21 nucleótidos) impide su detección en geles de agarosa (figura 37-A).

Se observó la presencia de siRNAs específicos para el gen *Ikkα* en todas las líneas analizadas que portan el transgén SUPER-1A (SUPER-1A-1, A-2, A-3 y A-6) y el transgén SUPER-1B (SUPER-1B-1, B-2 y B-3) (figura 37). De esta forma comprobamos que el uso de este tipo de vectores de expresión de siRNAs en transgénesis clásica, mediante microinyección pronuclear, es completamente factible. No se encontró correlación entre el número de copias del transgén y la expresión de los siRNAs. Las líneas de mayor expresión correspondieron a transgénicos SUPER-1A (SUPER-1A-1, A-2 y A-6). Esto indica que los transgenes basados en el vector pSUPER se expresan más eficientemente en ausencia de ADN procariótico (procedente del vector plasmídico), como ocurre con los transgenes cuya transcripción es dependiente de ARN Pol II. Por otro lado, comprobamos que los tejidos analizados para una misma línea no expresaban el siRNA en la misma cantidad e incluso algunos no lo expresaban, al menos a un nivel detectable con las técnicas empleadas (así, la expresión en cerebro fue mayor que en otros tejidos en la mayoría de las líneas, mientras que en hígado no se detectó expresión en todas las líneas) (figura 37). Esta variación en la expresión entre los diferentes tejidos contrasta con la asunción, generalizada en la literatura, de que la expresión de este promotor sea ubicua.

Para conocer con más detalle el patrón de expresión conferido por el promotor H1 en ratones transgénicos, analizamos la presencia de siRNAs específicos de *Ikkα* en un total de 11 tejidos de un mismo animal mediante *Northern blot*. Escogimos la línea SUPER-1A-1 por ser la de mayor expresión del transgén. Los resultados mostraron que

existe una variación de hasta 10 veces en los niveles de expresión de siRNAs de los distintos tejidos analizados (figura 38; véase cerebro e hígado).

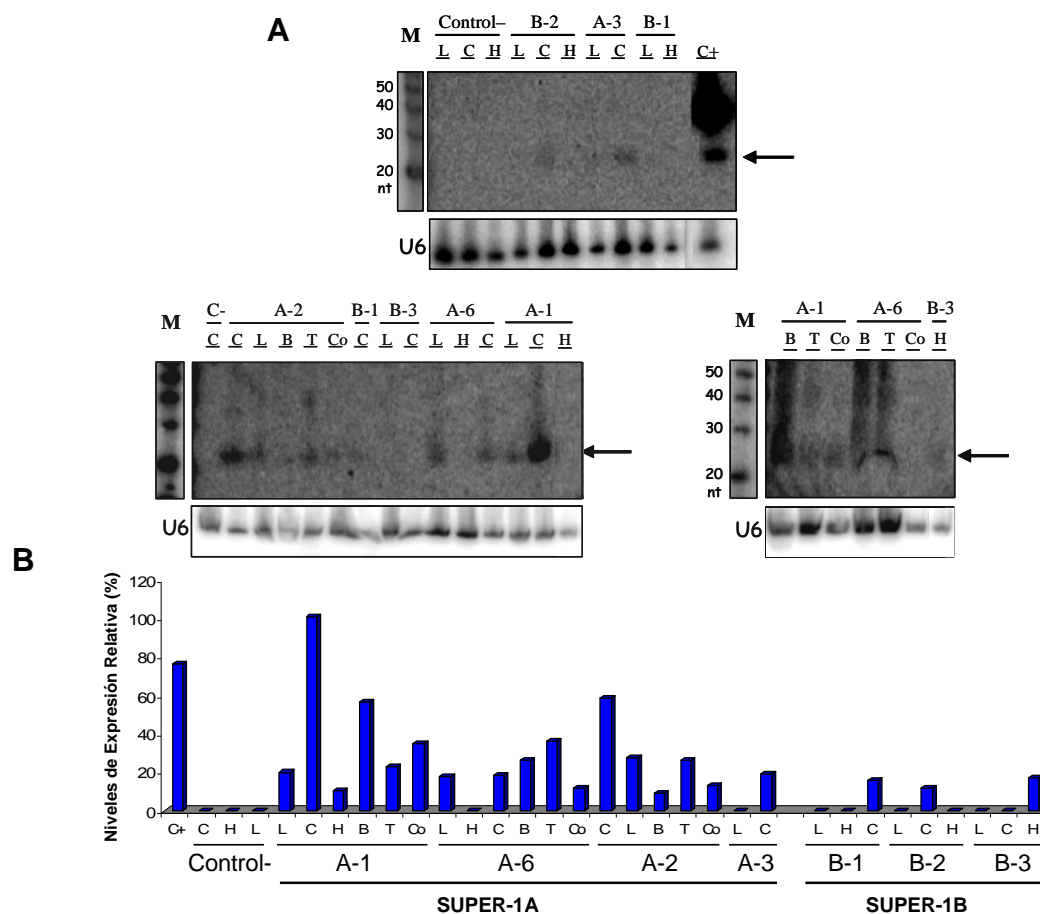


Figura 37. Análisis por *Northern blot* de la expresión del siRNA específico para el gen *Ikk α* en las líneas transgénicas SUPER-1A (A-1, A-2, A-3 y A-6) y SUPER-1B (B-1, B-2 y B-3). (A) La flecha indica la movilidad esperada para el siRNA. Como control positivo se utilizó una muestra correspondiente a ARN de células HEK-293T cotransfectadas con el vector SUPER-1 y pRC- β Actin-3xHA-IKK α , donde se demostró anteriormente que funcionaba la interferencia (figura 34). L= Piel de lomo, C= cerebro, H= hígado, B= bazo, T= timo, Co= corazón. (B) Cuantificación del nivel de expresión observado en los geles representados en A. Cada valor está referido a su correspondiente nivel de carga obtenido con la hibridación de la sonda U6; los niveles se representan en porcentajes relativos a la muestra de mayor valor.

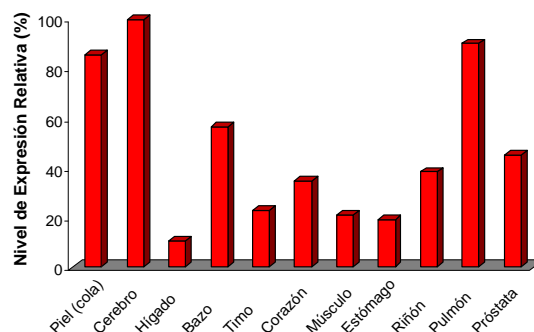


Figura 38. Cuantificación del nivel de expresión del transgén SUPER-1A en diferentes tejidos de la línea SUPER-1A-1. Representación gráfica del patrón de expresión de SUPER1-A en 11 tejidos diferentes de un mismo animal de la línea SUPER-1A-1 (determinado por *Northern blot*). Cada valor está referido a su nivel de carga correspondiente obtenido con la hibridación U6 y los niveles se representan en porcentajes relativos a la muestra de mayor valor.

Para determinar si las diferencias observadas en los niveles de expresión de los siRNAs en los tejidos analizados reflejaban el patrón de expresión endógeno del promotor H1, estudiamos la expresión de H1-RNA (producto generado de la transcripción a partir del promotor H1; geneID: 85495) en 12 tejidos seleccionados de ratón. Además, aunque es asumido que la expresión de H1-RNA es ubicua, desconocemos la eficacia del promotor H1 en diferentes tejidos. Para ello, diseñamos unos oligonucleótidos que amplificaban un fragmento correspondiente a una región determinada del gen H1 (RPPH1) (Li y Williams, 1995) y se utilizó ese fragmento como sonda para el análisis de la expresión de H1 en diversos tejidos mediante *Northern blot*.

Nuestros datos indicaron que H1-RNA no es expresado en todos los tejidos analizados al mismo nivel; por el contrario, encontramos variaciones de hasta 4 y 5 veces en los niveles de expresión (figura 39; véase páncreas, músculo y piel de cola). De este análisis concluimos además que no existe correlación entre los niveles de expresión del transgén SUPER-1A en los tejidos analizados y el patrón de expresión mostrado por el promotor H1 en esos mismos tejidos. Así, tomando como ejemplo los datos obtenidos para hígado y cerebro, se observó que mientras que los niveles de expresión de H1-RNA eran muy similares en ambos tejidos (aproximadamente el 50%), los niveles de expresión del siRNA eran muy diferentes (alrededor del 100% y 10% respectivamente; compárense las figuras 38 y 39 para estos tejidos). Estas discrepancias podrían ser debidas a que la expresión de este tipo de transgenes esté sometida a efectos de posición; otra explicación no excluyente sería que los distintos niveles de siRNAs encontrados para cada tejido (figura 38) no reflejen el distinto nivel de transcripción a partir del promotor H1, sino que esté afectado por diferencias en la eficiencia de la maquinaria implicada en la generación de siRNAs entre los distintos tejidos.

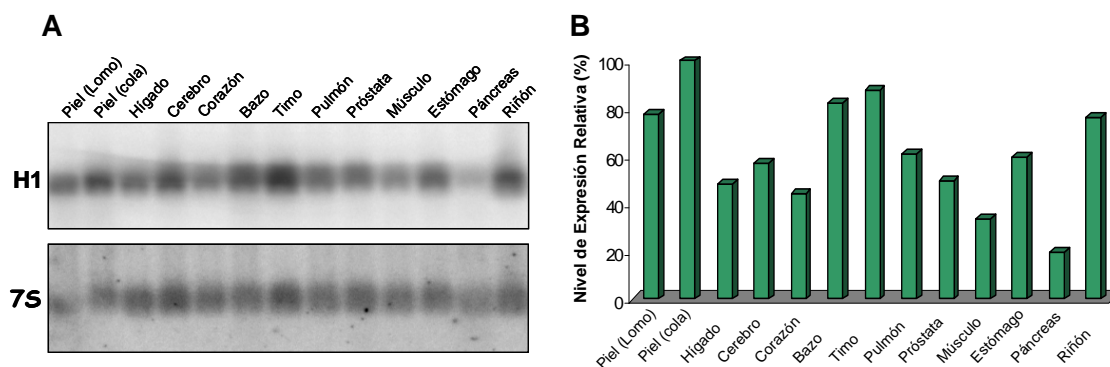


Figura 39. Análisis del patrón de expresión de H1-RNA en diferentes tejidos de la línea SUPER-1A-1. (A) Análisis por *Northern blot* del patrón de expresión endógeno del promotor H1. (B) Representación gráfica de la cuantificación de las bandas correspondientes a la expresión de H1-RNA, referido al control de carga 7S. Los niveles se representan en porcentajes relativos a la muestra de mayor valor. La expresión de H1-RNA varía hasta 5 veces al comparar diferentes tejidos.

4.2.2.4 Inhibición de la expresión de IKK α en los ratones transgénicos SUPER-1

El siguiente paso consistió en estudiar los niveles de inhibición de la expresión de IKK α en la línea de ratones transgénicos SUPER-1A-1 mediante PCR cuantitativa en tiempo real (RT-qPCR). Nos centramos en el análisis de piel de lomo, cerebro e hígado por nuestro interés inicial en inhibir la expresión de IKK α en piel, y por ser cerebro e hígado los tejidos con mayor y menor nivel de expresión del siRNA para IKK α , respectivamente. Los datos de expresión de IKK α provienen del análisis de 31 ratones diferentes para piel de lomo, 15 en el caso de cerebro y 11 para hígado. Los resultados obtenidos mostraron que, como consecuencia de la expresión del ARN de interferencia, la expresión de IKK α estaba disminuida en los ratones transgénicos SUPER-1A. El nivel de inhibición de la expresión de IKK α fue equivalente en los tres tejidos analizados (en torno al 50-60%; figura 40-B). Sin embargo, no se observó interferencia en todos los animales transgénicos, teniendo disminuida la expresión de IKK α en piel de lomo un 50% de los transgénicos; el 30% de los animales presentaba interferencia en la expresión de IKK α en cerebro y un 20% interfería en hígado (figura 40-A, círculos en verde). En el resto de animales se observaron niveles de expresión de IKK α similares a los controles (figura 40-A, triángulos en rojo).

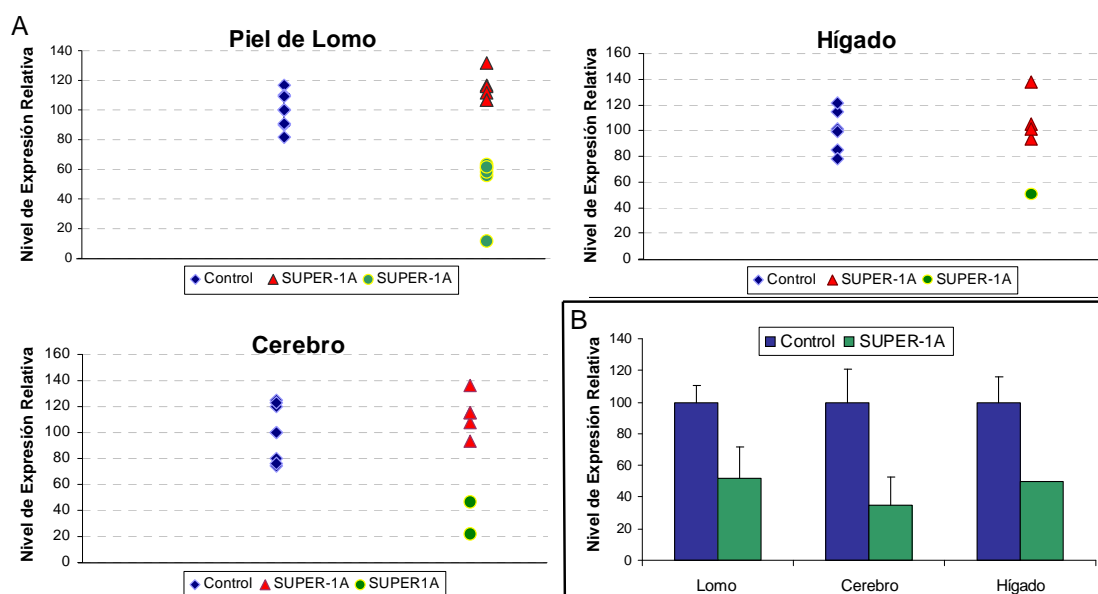


Figura 40. Análisis por RT-qPCR del nivel de expresión de IKK α en ratones transgénicos SUPER-1A. (A) Estudio del nivel de inhibición de IKK α en los ratones transgénicos SUPER-1A-1 respecto a animales control en piel de lomo, hígado y cerebro. Los niveles de inhibición se representan en porcentajes relativos a la media de los controles en cada análisis. Los círculos verdes indican los animales SUPER-1A que presentan una expresión disminuida de IKK α y los triángulos rojos representan los animales SUPER-1A que poseen niveles de expresión de IKK α similares a los controles. (B) Representación gráfica del nivel de inhibición de IKK α alcanzado en los animales transgénicos SUPER-1A. Únicamente se reflejan aquellos animales que poseen disminuida la expresión de IKK α .

Estos resultados indican además que no existe relación entre los niveles de expresión del transgén y la eficiencia de inhibición alcanzada en los tejidos estudiados. Así, aunque los niveles de expresión del transgén en hígado son inferiores a los obtenidos en piel de lomo y cerebro, los valores medios de interferencia alcanzados están alrededor del 50-60% en todos los casos.

4.2.2.5 Los animales SUPER-1A presentan alteraciones en pelo

Analizamos las posibles alteraciones fenotípicas debidas a la disminución de la expresión de $IKK\alpha$ en las distintas líneas de animales transgénicos SUPER-1. Los animales fueron viables en todas ellas, sin mostrar en ninguna de las líneas grandes alteraciones histológicas. Sin embargo, a nivel macroscópico se apreciaron diferencias sutiles en el aspecto del pelo en un porcentaje (aproximadamente el 55%) de los ratones transgénicos de la línea SUPER-1A-1. Estos animales presentaban el pelo algo erizado y ondulado, principalmente en los primeros ciclos de crecimiento (en los que todos los pelos crecen de forma sincrónica).

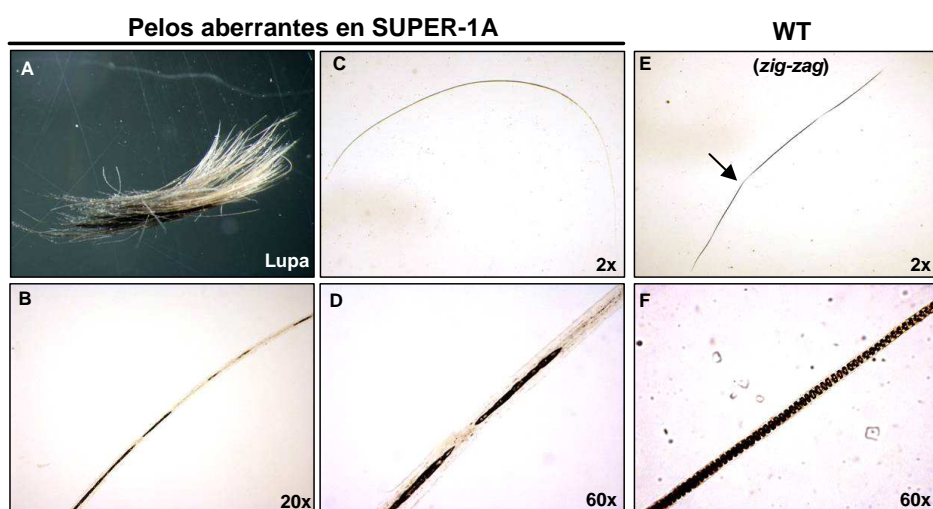


Figura 41. Presencia de pelos aberrantes en los ratones transgénicos SUPER-1A-1. (A-D) Imágenes representativas de pelos aberrantes en ratones SUPER-1A-1. Se observa dilución de color (A, B) y una sola capa de células en la médula (D). (E, F) Imágenes de un folículo normal (WT).

El análisis detallado de los pelos mostró que los ratones transgénicos SUPER-1A-1 presentaban una pérdida de color brusca desde la mitad del pelo hacia la punta (figura 41 A, B) debido a la ausencia de células aéreas en la médula (lo normal es que la dilución de color sea progresiva por pérdida de melanina en las células aéreas). También se observó la presencia de pelos aberrantes en los ratones transgénicos SUPER-1A-1 que no se corresponden con ninguno de los cuatro tipos de pelo presentes en el ratón (*guard*, *awl*, *auchene* y *zig-zag*). Los pelos aberrantes son largos y finos, con una sola capa de células aéreas en la médula (figura 41-C). Por el grosor podrían ser *zig-zag*, pero carecen

de los dos o tres estrechamientos o “codos” característicos de los pelos *zig-zag* (comparar figura 41-C y 41-E, flecha). Por la forma podrían ser *awl*, pero éstos son más gruesos (dos o más filas de células aéreas) que los pelos aberrantes (figura 41 D, F). Por otro lado, el índice medular (relación entre el diámetro de la médula y el diámetro del pelo) es inferior en los pelos aberrantes; normalmente el índice medular tiene valores superiores a 0.5, mientras que en los pelos aberrantes es de 0.2.

Las alteraciones en la morfología del pelo suelen ir asociadas a modificaciones en el ciclo de crecimiento de los folículos pilosos. Por ello, realizamos experimentos de depilación para conocer si la disminución de la expresión de $IKK\alpha$ inducía alteraciones en el ciclo de crecimiento del pelo. Se depilaron 11 ratones transgénicos de la línea SUPER-1A-1 y 9 controles en el día 24 de edad, correspondiente al final del primer telogén e inicio del segundo anagén (Kawabe y cols., 1991), y se realizó un seguimiento diario del crecimiento del pelo como consecuencia de la depilación. En nuestro experimento, los animales control presentaron un rápido crecimiento de pelo a partir del cuarto día tras ser depilados, como consecuencia de la entrada de los folículos en la fase de anagén, y a los 11 días los animales exhibieron cubierta toda la superficie depilada del lomo (figura 42-A, imagen derecha). Sin embargo, en el caso de los ratones transgénicos, un alto porcentaje de ellos (el 64%) mostró crecimiento retrasado en el día 11 tras la depilación (figura 42-A, imagen izquierda); algunos de estos animales, incluso, no presentaron indicios de crecimiento de pelo en esta fecha (figura 42-A', imagen izquierda), comenzando a ser visibles a los 18 días.

El análisis histológico de la piel del lomo de los ratones depilados mostró en los transgénicos SUPER-1A-1 focos de desorganización de los folículos pilosos anagénicos, caracterizados por la presencia de folículos distorsionados y procesos degenerativos de los bulbos pilosos, con lisis celular y liberación a la dermis de gránulos de melanina (figura 42 D-G, triángulos). Además, los bulbos pilosos degenerados estaban rodeados de un denso infiltrado inflamatorio de células mononucleadas (figura 42 F, G; flechas).

En la tabla 4 se resumen las alteraciones observadas en los folículos pilosos, indicándose las frecuencias con las que se presentan dichas alteraciones. Hay que señalar que no todos los animales transgénicos que mostraron bajos niveles de $IKK\alpha$ por RT-qPCR presentaban todos los fenotipos. Además, algunos de los animales con fenotipo no mostraron (en análisis por RT-qPCR) bajos niveles de expresión de $IKK\alpha$.

En conjunto, los ratones transgénicos que tienen niveles de expresión de $IKK\alpha$ disminuidos como consecuencia de la interferencia en la expresión de su ARN, nos han proporcionado información adicional a la obtenida mediante el estudio de las células

HaCaT (en cultivo en placa y en equivalentes de piel) y los ratones K5-IKK α . La alteración de los folículos pilosos y del ciclo del pelo en los ratones SUPER-1A indicaría que la disminución de IKK α compromete más la fisiología epidérmica de los ratones que su exceso de expresión, lo que está de acuerdo con los resultados de letalidad perinatal descritos para la deficiencia de IKK α (Hu y cols., 1999; Li y cols., 1999a; Takeda y cols., 1999).

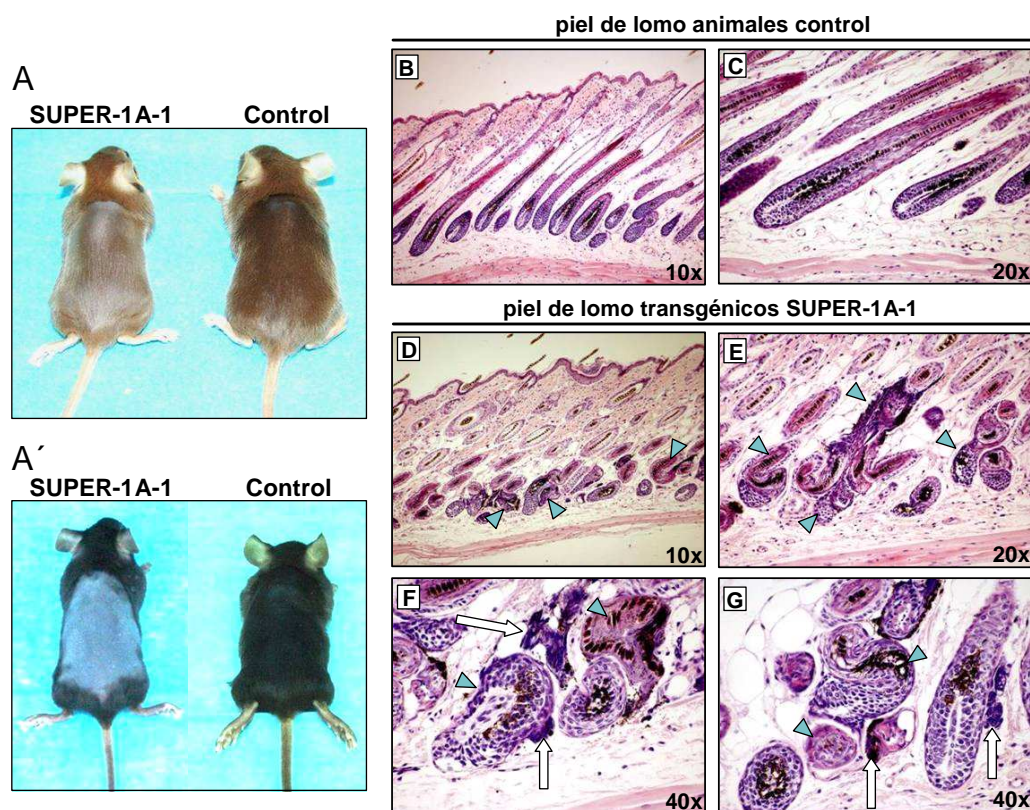


Figura 42. Retraso en la entrada de los folículos en el segundo anágen y alteración de los bulbos pilosos en ratones transgénicos SUPER-1A-1. (A y A') Aspecto del lomo de los animales transgénicos y controles en el día 11 tras ser depilados. (B-G) H/E de piel de lomo de animales control (B, C) y transgénicos SUPER-1A-1 (D-G). Se observa desorganización de los folículos pilosos anagénicos y degeneración de los bulbos pilosos en los animales SUPER-1A-1 (triángulos), así como un denso infiltrado inflamatorio de células mononucleadas (flechas en F, G).

Animales con alteraciones en la morfología y crecimiento de los folículos		
Fenotipo	Wt	Tg
Pelo lanoso	0/15	11/20
Retraso en crecimiento de folículos	0/9	7/11
Folículos alterados	0/9	5/11

Tabla 4. Esquema de las alteraciones fenotípicas en los folículos pilosos de ratones transgénicos SUPER-1A-1. Se indican las frecuencias con las que aparecen las alteraciones en los ratones transgénicos (Tg) y sus hermanos control (Wt).

4.3 CYLD y la tumorigénesis epidérmica

Como se comenta en la introducción, a pesar de la frecuencia con la que aparecen los SCCs, existen muchos aspectos de su génesis que son todavía desconocidos. En un apartado anterior nos planteamos cómo se regulaba el proceso de diferenciación de los queratinocitos y de los carcinomas epidermoides, así como el origen de las diferentes variantes histológicas de SCCs. La subunidad IKK α y el regulador negativo de la vía de NF- κ B, CYLD, han sido relacionados con la diferenciación de los queratinocitos y/o la formación de tumores epidérmicos, por lo que han sido las principales moléculas analizadas en esta memoria. El estudio de la función de IKK α en células epidérmicas y en tumores SCCs nos ha permitido conocer por una parte más detalles sobre la diferenciación epidérmica y por otra, entender el origen de una de las variantes de SCC más agresiva, el SCC acantolítico o pseudoglandular. Ahora nos planteamos profundizar en el conocimiento de los pasos que conducen al desarrollo de un tumor (maligno) de piel. En este sentido, se ha encontrado que, a menudo, hay mutaciones en *Pten*, aunque no siempre se detectan (Petersen y cols., 1998; Kubo y cols., 1999). También se han identificado mutaciones en *p53* en una gran proporción de SCCs (Ziegler y cols., 1993); sin embargo, estas mutaciones pueden estar de forma latente en la piel durante muchos años sin que se desarrolle un tumor. Estos datos sugieren la existencia de factores adicionales importantes para el desarrollo de los SCCs. Hemos escogido como modelo de estudio para abordar esta cuestión los tumores generados por mutaciones en el gen *CYLD*, la mayor parte de las veces benignos, aunque en ciertos casos pueden metastatizar, por lo que suponen un buen modelo para este análisis.

4.3.1 La inhibición de la actividad de CYLD incrementa la agresividad tumoral de los SCCs

Hemos expresado una forma dominante negativa de CYLD, que denominamos CYLD-mutante, en la línea epidérmica transformada de ratón PB. El mutante de CYLD que hemos utilizado posee un cambio en el aminoácido 601 de su centro activo (Cys→Ser), generando una forma catalíticamente inactiva y que compite con la forma salvaje de CYLD (Brummelkamp y cols., 2003). Estudiamos el efecto de la expresión de CYLD-mutante en tumorigénesis mediante experimentos de carcinogénesis en ratones inmunodeficientes. Para ello, transfectamos células PB de manera estable e independientemente con los vectores β -actin-CYLD-mut y pBZ y se obtuvieron las poblaciones PB-CYLD-mut1, 2 y 3 y PB-Control. Comprobamos la expresión del transgén CYLD-mut en las distintas poblaciones obtenidas mediante la detección del epítipo HA por *Western blot* y por RT-qPCR (figura 43 A, B). Con estas células transfectadas, realizamos ensayos de carcinogénesis por inyección subcutánea de las

células PB-CYLD-mut1 y 3 y PB-Control en ratones inmunodeficientes (ver apartado 3.21) y se realizó un seguimiento de la aparición y evolución de los tumores. Los tumores PB-CYLD-mut se detectaron por primera vez el día 20 post-inoculación, mientras que los PB-Control no tuvieron un tamaño apreciable hasta el día 26 (figura 43-C). Estas diferencias en el tamaño de los tumores fueron aumentando en días sucesivos hasta que finalizamos el experimento en el día 32 (figura 43-D, flechas). Además, los ratones inyectados con las células PB-CYLD-mut desarrollaron un 20% más de tumores que las células control (no mostrado). Por otro lado, los tumores PB-CYLD-mut presentaban un aspecto enrojecido (figura 43-D), por lo que en el momento de la toma de muestras en el día 32 realizamos un ensayo de permeabilidad vascular mediante la inyección de azul de Evans. Este ensayo mostró una tinción más extensa e intensa en los tumores PB-CYLD-mut, lo que indica un aumento en la permeabilidad vascular (figura 43-D). También comprobamos, mediante la detección del epítipo HA, que estos tumores mantenían la expresión del transgén CYLD-mut (figura 43-A). Los resultados obtenidos con las dos poblaciones de células PB-CYLD-mut fueron muy parecidos, por lo que se representan los de PB-CYLD-mut1.

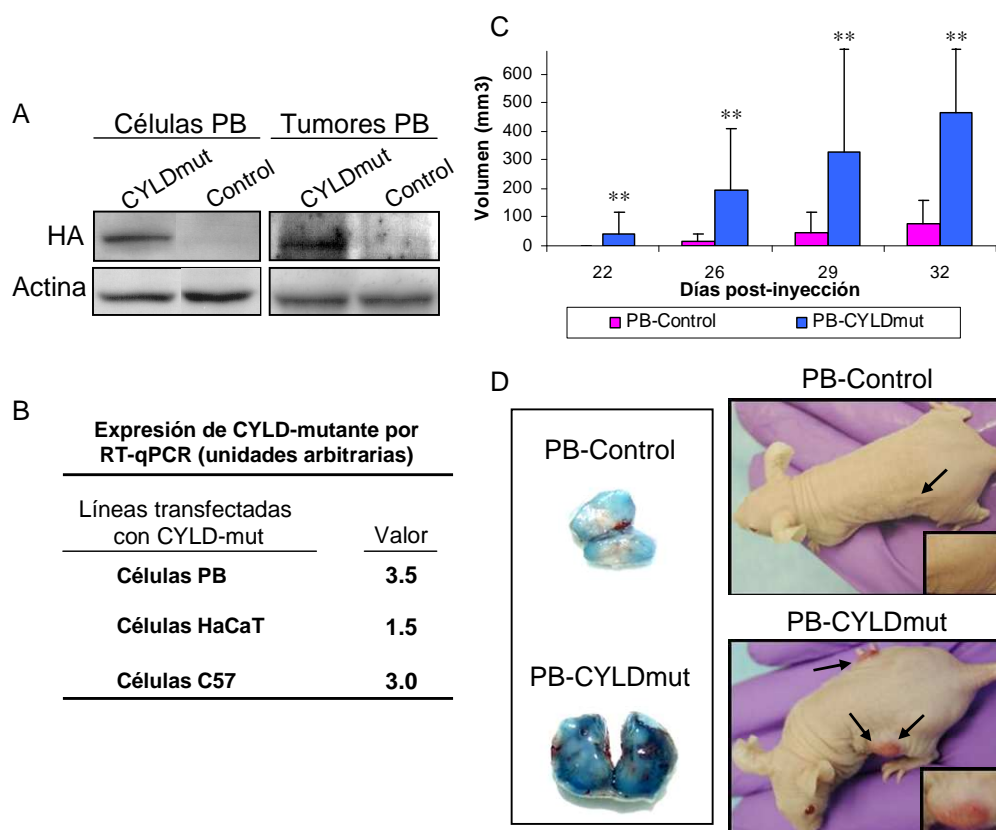


Figura 43. Ensayos de carcinogénesis de células PB-CYLD-mut y PB-Control en ratones inmunodeficientes. (A) Análisis de la expresión del epítipo HA por *Western blot* en células en cultivo PB-CYLD-mut y PB-Control y de tumores. (B) Cuantificación por RT-qPCR del nivel de expresión de CYLD-mut en células PB, HaCaT y PDVC57, normalizado respecto al gen β -actina humano y relativo al nivel endógeno de *CYLD* (unidades arbitrarias). (C) Imagen donde se aprecian las diferencias en el tamaño y el aspecto de los tumores PB-Control y PB-CYLD-mut en el día 22 post-inoculación, así como la diferente permeabilidad vascular que presentan ambos tipos de tumores en el día 32 (medida por la tinción con azul de Evans). ** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.01$).

El análisis histológico reveló que tanto los tumores PB-CYLD-mut como PB-Control eran carcinomas epidermoides (SCCs), aunque con claras diferencias entre ambos genotipos con respecto al grado de diferenciación. Los SCCs inducidos por las células PB-Control eran bien diferenciados, conteniendo abundantes globos córneos (cúmulos de queratina) rodeados de células bien diferenciadas (figura 44-A). Por el contrario, en los tumores PB-CYLD-mut se apreciaron únicamente zonas de SCCs indiferenciadas viables (figura 44 B, C; asteriscos), ya que las zonas diferenciadas (correspondientes a gran parte del tumor) aparecían degeneradas (figura 44 B, C; triángulos verdes), observándose en estas áreas restos de queratina (figura 44-B, triángulo amarillo), células degeneradas (necróticas) y apoptóticas y abundante infiltrado inflamatorio con células polimorfonucleadas (figura 44 B, C; flechas). Por tanto, este resultado indicó un incremento en la malignidad de los tumores PB-CYLD-mut, que fue confirmado por el análisis inmunohistoquímico de la queratina K8 –queratina indicadora de conversión maligna de los tumores (Larcher y cols., 1992; Casanova y cols., 2004)–, que mostró una tinción muy abundante en los tumores PB-CYLD-mut, mientras que los controles presentaron muy poca tinción, limitada a zonas puntuales (figura 44 D, E).

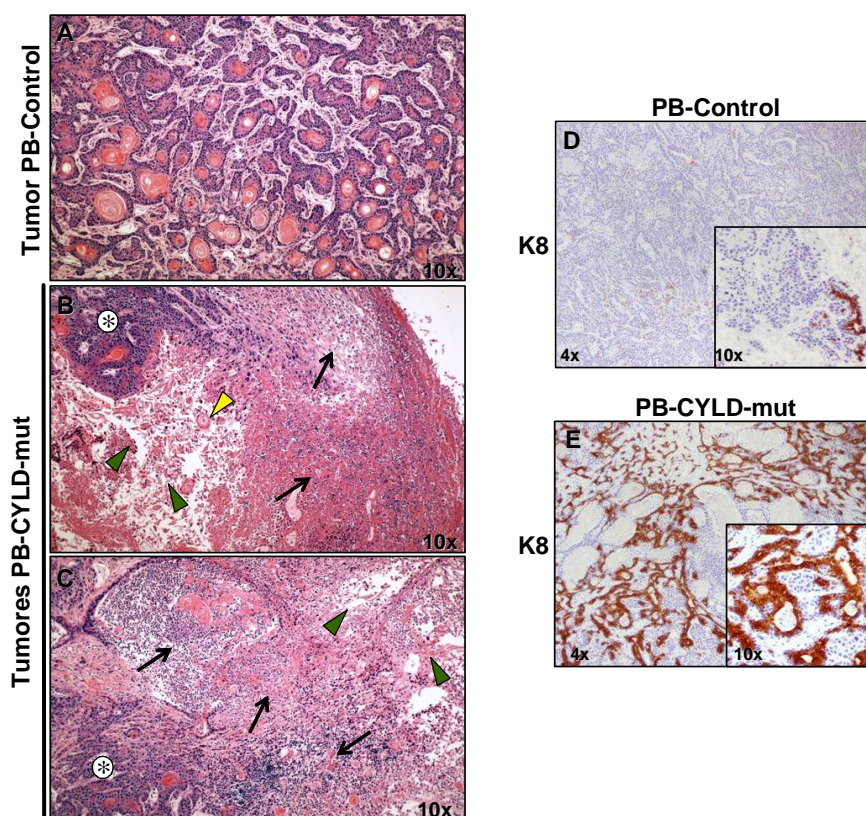


Figura 44. Análisis histológico e inmunohistoquímico de tumores PB-CYLD-mut y PB-Control. (A-C) Tinción H/E mostrando un fenotipo SCC bien diferenciado en los tumores PB-Control (A) y un fenotipo más indiferenciado (B, C; asteriscos) con abundante presencia de infiltrado inflamatorio (B, C; flechas) y de degeneración de las zonas más diferenciadas (B, C; triángulos). (D, E) Análisis de la expresión de la queratina K8 mediante tinción inmunohistoquímica en cortes histológicos de tumores PB-Control y PB-CYLD-mut.

El aspecto más irrigado y la mayor permeabilidad que presentaban los tumores PB-CYLD-mut, nos indujo a pensar que tendrían muy incrementada la angiogénesis, por ello analizamos por *Northern-blot* la expresión del factor pro-angiogénico VEGF. El resultado mostró tan sólo un ligero aumento de VEGF en algunos tumores PB-CYLD-mut (figura 45-A). El hecho de no detectarse mayores niveles de expresión pensamos que podría deberse a la degeneración tan acusada y la necrosis celular masiva que se produce en los tumores PB-CYLD-mut (figura 44 B, C). Dado que las células son una población mucho más homogénea que los tumores y no presentan estos problemas de degeneración que observamos en los tumores PB-CYLD-mut, decidimos analizar en ellas el nivel de expresión de VEGF mediante análisis de *Northern-blot*. De esta forma comprobamos un incremento considerable de este factor angiogénico en PB-CYLD-mut respecto a las células PB-Control (figura 45-B). También observamos un aumento de la expresión de trombospodina (Tsp) 1 y Tsp 2 en PB-CYLD-mut (figura 45-B). Estos factores son generalmente considerados anti-angiogénicos aunque también se ha descrito que pueden actuar como pro-angiogénicos, especialmente Tsp 1 (Esemuede y cols., 2004).

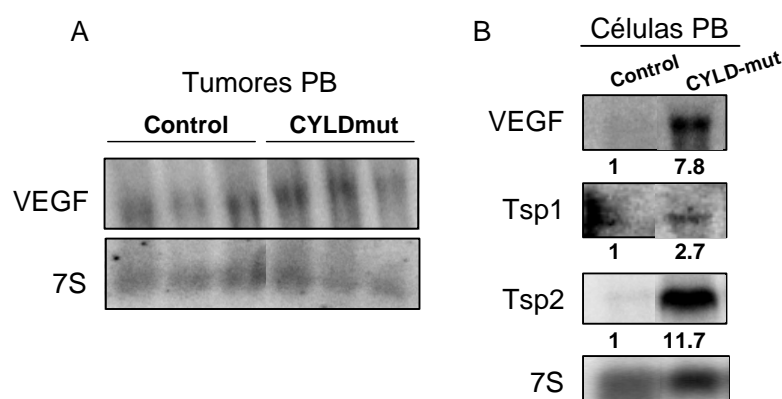


Figura 45. Análisis de factores angiogénicos en células y tumores PB-CYLD-mut y PB-Control. (A) Análisis del nivel de expresión de VEGF en tumores PB-CYLD-mut y PB-Control, a partir de ARN total y por *Northern blot*. (B) Análisis del nivel de expresión de los factores VEGF, Tsp1 y Tsp2 en células PB-Control y PB-CYLD-mut por *Northern blot*. Se indican los niveles de expresión referidos a su nivel de carga determinado por 7S. Tsp: trombospodina.

4.3.2 Aumento de los rasgos de malignidad en líneas epidérmicas tumorigénicas por expresión del dominante negativo de CYLD

Para estudiar si el incremento en VEGF observado en las células PB por expresión de la forma CYLD-mutante era un fenómeno exclusivo de este tipo celular o si era una propiedad más general del dominante negativo, generamos otras líneas celulares epidérmicas (HaCaT y PDVC57) que contenían la misma construcción de CYLD-mut. Transfectamos células PDVC57 y HaCaT de manera estable con los vectores β -actin-CYLD-mut (C57-CYLD-mut y H-CYLD-mut) y pCDNA3 (C57-Control y H-Control) y comprobamos la expresión del transgén CYLD-mutante en las distintas poblaciones

obtenidas mediante RT-qPCR (figura 43-B). A continuación, comprobamos por *Northern blot* que las poblaciones celulares H-CYLD-mut y C57-CYLD-mut, que expresaban el dominante negativo de CYLD, presentaban un incremento en los niveles de expresión de VEGF respecto a sus controles. Al igual que ocurría en las células PB-CYLD-mut, también observamos un importante aumento de los factores Tsp 1 y Tsp 2 en estas células (tabla 5). Por tanto, nuestros datos indican que la forma mutada de CYLD incrementa la expresión de factores angiogénicos en células epidérmicas no tumorales (HaCaT) y tumorales de distinto grado de malignidad (PB y PDVC57).

Cuantificación de la expresión del ARN de VEGF, TSP1 y TSP2 en células PDVC57 y HaCaT (unidades arbitrarias)

		VEGF	TSP1	TSP2
Células PDVC57	Control	1	1	1
	CYLD-mut	2.1	9.5	8.4
Células HaCaT	Control	1	-	1
	CYLD-mut	6.1	-	4.1

Tabla 5. El dominante negativo de CYLD produce un incremento en la expresión de factores angiogénicos en células HaCaT y PDVC57. Cuantificación mediante *Northern blot* de la expresión de los factores VEGF, Tsp1 y Tsp2 de las poblaciones celulares C57-CYLD-mut y HaCaT-CYLD-mut respecto a sus controles correspondientes, y referidos a su nivel de carga determinado por 7S.

Posteriormente analizamos si, como ocurría en los tumores, CYLD-mutante era capaz de incrementar la agresividad de las células. Para este estudio, escogimos las células PDVC57 por tratarse de una línea con un grado de malignidad mayor que el de las células PB. En primer lugar caracterizamos su potencial proliferativo mediante curvas de crecimiento. Observamos que a partir de las 72h de cultivo las células C57-CYLD-mut experimentaban un crecimiento mucho más rápido que las células control (figura 46-A). En ensayos de eficiencia en la formación de colonias, aunque no se apreciaron cambios en el número total de colonias que se formaban en C57-CYLD-mut y C57-Control, sí se observaron colonias de mucho mayor tamaño en C57-CYLD-mut, lo que indica de nuevo una mayor capacidad proliferativa de estas células (figura 46 B, C). Los ensayos de TUNEL no mostraron diferencias entre ambas poblaciones, lo que indica que las diferencias en el número de células no son debidas a una mayor muerte celular en C57-Control (no mostrado). Tampoco se observaron diferencias en apoptosis cuando se trataron las células con TNF- α y CHX, encontrándose un alto porcentaje de supervivencia celular en ambos tipos celulares (no mostrado), en contraste con lo descrito por otros autores que señalan que mutaciones en CYLD previenen la muerte celular tras el tratamiento con TNF- α y CHX (Brummelkamp y cols., 2003). Esta discrepancia con nuestros resultados puede ser debida a que las células PDVC57 tengan una resistencia intrínseca a la muerte celular por ser una línea tumorigénica.

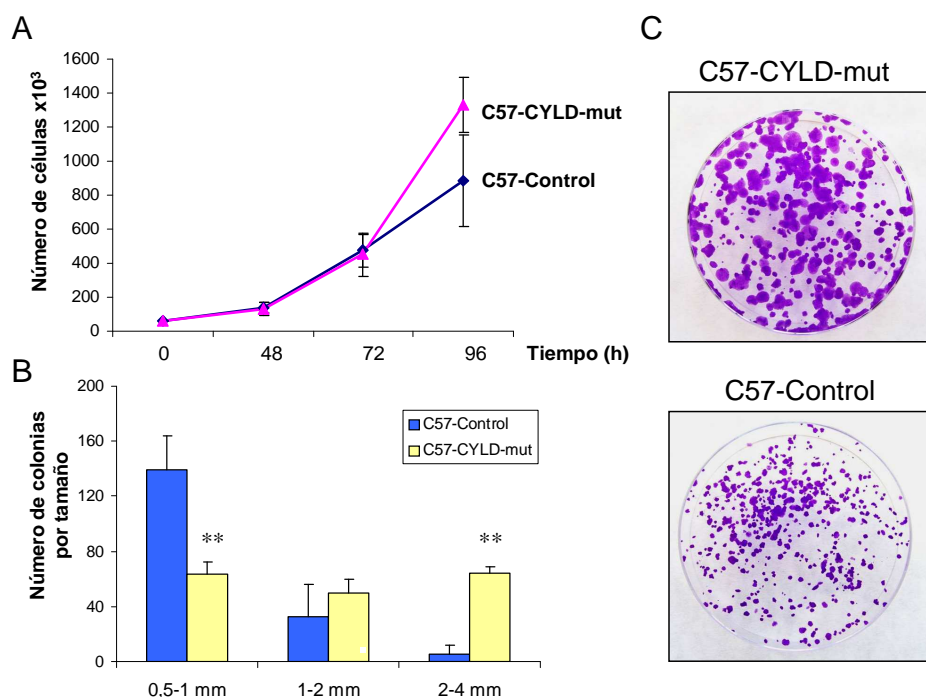


Figura 46. Incremento de la capacidad proliferativa en la población celular C57-CYLD-mut. (A) Curvas de crecimiento de las poblaciones C57-CYLD-mut y C57-Control durante 96 h de cultivo. (B) Medida de la distribución de colonias por tamaño en C57-CYLD-mut y C57-Control. El número total de colonias no varía entre ambos genotipos. (C) Imagen representativa de la diferencia en el tamaño de las colonias observada entre C57-CYLD-mut y C57-Control. ** Diferencias estadísticamente significativas con respecto al control ($p < 0.01$).

Analizamos también la vía de señalización de NF- κ B en las células C57-CYLD-mut y C57-Control tras la estimulación con TNF- α , y comprobamos que la unión de la subunidad p65 al ADN era muy similar en los dos tipos celulares (figura 47-A), lo cual sugiere que el efecto de CYLD-mut sobre el potencial proliferativo de las células PDVC57 es independiente de la vía clásica de activación de NF- κ B. Este resultado se corresponde con aquellos estudios que describen que la ausencia de CYLD en queratinocitos no afecta a la vía clásica de activación de NF- κ B (subunidades p65 y p50) (Massoumi y cols., 2006). Otros trabajos también establecen que CYLD puede desempeñar otras funciones independientes de su función como regulador negativo de NF- κ B, entre las que se encuentran su implicación en la regulación de la señalización a través del receptor de células T (TCR) (Reiley y cols., 2006).

Se ha descrito que VEGF proporciona señales de supervivencia que pueden incrementar la viabilidad de las células en cultivos en suspensión (Solovey y cols., 1999). Como las células C57-CYLD-mut tienen incrementada la expresión de VEGF, estudiamos su capacidad de crecer en suspensión. Después de 24 h de cultivo en suspensión, se cultivaron las células en condiciones que favorecían su adhesión a las placas de cultivo y se evaluó a las 48 h el número de colonias que se habían formado.

Los resultados del ensayo mostraron un aumento en la supervivencia de las células C57-CYLD-mut respecto al control, ya que mientras que las células control apenas sobrevivían en las condiciones ensayadas, las células C57-CYLD-mut originaban un elevado número de colonias (figura 47-B). También analizamos la concentración del factor VEGF soluble en el medio sobrenadante de los cultivos celulares y nuevamente comprobamos un aumento significativo en los niveles de VEGF en C57-CYLD-mut respecto a C57-Control (figura 47-C). Todos estos resultados son indicativos de un posible aumento en las propiedades tumorigénicas de las células PDVC57 debido a la sobreexpresión del dominante negativo de CYLD.

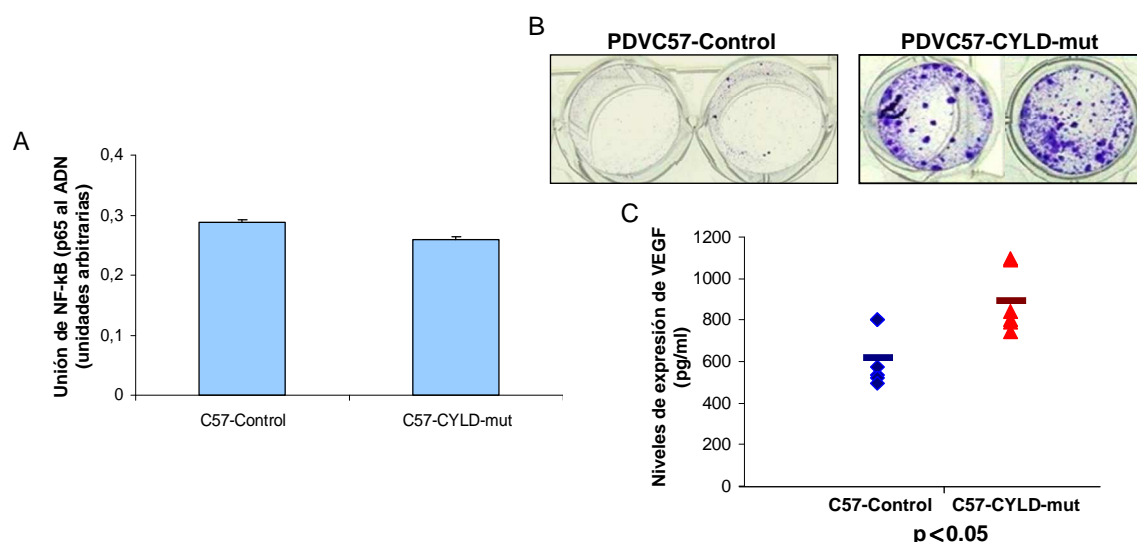


Figura 47. El dominante negativo de CYLD favorece el crecimiento en suspensión de las células PDVC57. (A) Actividad de unión de NF-κB (subunidad p65) al ADN mediante un ensayo colorimétrico a partir de extractos totales de células C57-Control y C57-CYLD-mut incubados previamente con TNF-α. Se representan los niveles obtenidos en unidades arbitrarias. (B) Ensayo de crecimiento en suspensión de las células C57-CYLD-mut y C57-Control donde se observan las colonias formadas después de tener las células 24 h en suspensión. (C) Representación del nivel de expresión de VEGF en el medio de cultivo de las células C57-CYLD-mut y control mediante ELISA. Diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$).

Por tanto, nuestros resultados indican que mutaciones en CYLD que anulan su función conllevan un aumento en la malignidad de células epidérmicas tumorigénicas y de los SCCs (medida como mayor capacidad de crecimiento en suspensión y menor grado de diferenciación tumoral). Este incremento en la agresividad celular parece ser debido a un aumento en la expresión de los factores angiogénicos VEGF, Tsp 1 y Tsp 2. Estos resultados son importantes porque hasta ahora se relacionaban las mutaciones en CYLD con crecimientos tumorales benignos, mientras que nuestros datos muestran que el comportamiento benigno o agresivo de CYLD-mut puede depender de las mutaciones génicas acumuladas por las células en las que se produce la mutación. Este estudio tiene además especial relevancia porque la mutación analizada es la que presentan algunos pacientes de cilindroamntosis hereditaria.

5 DISCUSIÓN

5.1 IKK α en la diferenciación de los queratinocitos

Nuestros resultados muestran que el incremento en la expresión de IKK α en la línea de queratinocitos humanos HaCaT acelera la estratificación y diferenciación temprana y permite la diferenciación terminal (formación de corneocitos), que no completan las células H-Control en el modelo de diferenciación en placa utilizado. Estos resultados coinciden con los obtenidos en el análisis de los equivalentes de piel, que muestran una estratificación acelerada de los queratinocitos H-IKK α , aunque desordenada y displásica, como se pone de manifiesto en las tinciones histológicas y en la expresión deslocalizada de involucrina, marcador temprano de diferenciación. Además, los equivalentes de piel H-IKK α expresan marcadores de diferenciación terminal (loricrina), a diferencia de los equivalentes de piel control. Estos resultados demuestran el papel fundamental de IKK α en el proceso de diferenciación de los queratinocitos humanos. No hemos encontrado diferencias importantes en la expresión de los miembros de la vía de señalización de NF- κ B analizados, lo cual parece indicar que la función de IKK α en diferenciación es independiente de la actividad NF- κ B, al igual que se ha sugerido anteriormente en otros estudios realizados en ratón (Hu y cols., 2001).

Hemos comprobado que los niveles de expresión de cadherina-E están aumentados en los queratinocitos H-IKK α y que el bloqueo funcional de cadherina-E inhibe el efecto de IKK α sobre la diferenciación de los queratinocitos. Siendo cadherina-E una molécula esencial en la diferenciación epidérmica (su ausencia inhibe *in vitro* el proceso de estratificación, e *in vivo*, provoca defectos en la diferenciación terminal) (Jensen y cols., 1997; Young y cols., 2003; Tinkle y cols., 2004; Tunggal y cols., 2005), nuestros resultados sugieren que la vía de señalización de cadherina-E es un mecanismo esencial a través del cual IKK α regula las propiedades de diferenciación de los queratinocitos. Se ha propuesto que IKK α regula el desarrollo de la epidermis mediante un factor soluble (KDIF), el cual actuaría de forma paracrina o autocrina induciendo la diferenciación de los queratinocitos (Hu y cols., 1999; Hu y cols., 2001; Gareus y cols., 2007). Dado que se ha sugerido que la expresión de KDIF es estimulada por la interacción epitelio-mesénquima (también necesaria para la diferenciación epidérmica) y que cadherina-E está implicada en procesos en los que se produce una transición epitelio-mesénquima, como en invasión y en el desarrollo embrionario (Cano y cols., 2000), sería posible que cadherina-E tuviese una función en la vía de señalización de KDIF.

Se ha descrito que los principales mecanismos de silenciamiento de cadherina-E en diferentes tipos de tumores y líneas celulares tumorigénicas son la hipermetilación de islas CpG, la represión transcripcional y la remodelación de cromatina por medio de HDACs y otros cofactores (Liu y cols., 2005; Peinado y cols., 2007). Uno de los principales reguladores de cadherina-E es Snail, que reprime la expresión de cadherina-E (Batlle y cols., 2000; Cano y cols., 2000). Sin embargo, nuestros resultados sugieren que Snail no está implicado en el incremento de expresión de cadherina-E observado en las células H-IKK α , ya que mientras que las células y equivalentes control no expresan Snail, sí se detecta su expresión tanto en las células como en los equivalentes H-IKK α . Dado que IKK α está implicada en la activación transcripcional de genes que no son dianas de NF- κ B mediante lo que se denomina función nuclear de IKK α , que causa la liberación de I κ B α (asociado a HDACs) y permite de este modo la acetilación de histonas y la transcripción génica (Aguilera y cols., 2004), podría ser que IKK α regulase la expresión de cadherina-E por un mecanismo similar, permitiendo la activación transcripcional de cadherina-E por acetilación de su promotor. Un mecanismo similar ha sido descrito en el caso de la regulación positiva de la expresión de cadherina-E por HNF3, donde se ha encontrado que HNF3 ejerce su función a través de la remodelación de cromatina, aún en presencia de Snail (Liu y cols., 2005). Esta hipótesis es compatible con los resultados obtenidos en la cinética de degradación de I κ B α tras el tratamiento con TNF- α , que muestran un retraso en la resíntesis de I κ B α en células H-IKK α . Se ha descrito que el aumento de I κ B α coincide con un incremento en los complejos represores que inhiben la actividad transcripcional de genes regulados por esta vía (Aguilera y cols., 2004). De esta manera, el retraso en la resíntesis de I κ B α en las células H-IKK α podría resultar en la ausencia de complejos represores, lo que favorecería la acetilación de las histonas y el incremento en la expresión de cadherina-E. Sin embargo, no podemos descartar otros posibles mecanismos o vías de señalización mediante los cuales IKK α podría estar regulando la expresión de cadherina-E.

El análisis del patrón de expresión génica de los equivalentes de piel H-Control y H-IKK α por *microarrays* muestra grupos de genes afectados por el incremento en la expresión de IKK α , con diferencias en la expresión estadísticamente significativas. Entre ellos, podemos destacar los relacionados con el desarrollo epidérmico y la diferenciación de los queratinocitos. Estos datos corroboran la importancia de IKK α en el proceso de diferenciación epidérmica. Es interesante resaltar la inducción, en los equivalentes H-IKK α , de genes implicados en la formación de la envuelta córnea y en el proceso de descamación, entre los que se encuentran los que codifican para transglutaminasa1, proteínas de pequeño tamaño ricas en prolina (*small proline-rich proteins*), cornifelina, suprabasina, S100P1, escielina o corneodesmosina. Es sabido que el estrato córneo es

fundamental para la funcionalidad de la barrera epidérmica, protegiendo frente a la entrada de patógenos y la pérdida de agua. Se ha descrito que IKK α juega un papel fundamental en este proceso, ya que los ratones carentes de IKK α en queratinocitos tienen defectos en la composición lipídica de la envuelta cornificada asociados a alteraciones en la función de la barrera epidérmica; estos ratones, de hecho, mueren por presentar un exceso de pérdida de agua a través de la piel (Gareus y cols., 2007). Alteraciones en la formación de la envuelta córnea o en la composición de la matriz lipídica también están asociadas a numerosas patologías cutáneas en humanos, entre las que se incluyen enfermedades inflamatorias de la piel como la psoriasis o la dermatitis atópica (Madison, 2003). Entre los genes nombrados anteriormente que participan en la formación de la envuelta córnea, es interesante destacar el incremento en el gen *cornifelina*, el cual se encuentra sobreexpresado en pacientes de psoriasis (Michibata y cols., 2004). Este gen se localiza en la región cromosómica 19q13 muy próxima al gen *suprabasina* (Park y cols., 2002), componente de la envuelta córnea y que también aumenta su expresión (al menos al analizar su ARNm) en los equivalentes de piel H-IKK α . Asimismo, encontramos que el gen que codifica para S100P1 (psoriasina1), originalmente caracterizado como un marcador de psoriasis y que se encuentra incrementado en otras enfermedades inflamatorias de la piel (Broome y cols., 2003), está también aumentado en los equivalentes H-IKK α . Estos datos nos hacen pensar que IKK α pueda tener un papel relevante en patologías cutáneas que impliquen alteraciones en la envuelta córnea. En el análisis por *microarrays* de los equivalentes de piel hemos encontrado también genes inducidos o reprimidos que desempeñan funciones relevantes en adhesión celular. Aunque no hemos profundizado por el momento en el análisis de estos genes, su estudio puede proporcionar datos novedosos acerca de los mecanismos moleculares por los que IKK α ejerce su función en el mantenimiento de la función epidérmica.

IKK α es la causante, cuando se expresa en células PDVC57 y se producen tumores subcutáneos con estas células transfectadas, de un cambio en la variante tumoral resultante, obteniéndose tumores acantolíticos o pseudoglandulares (discutido en el siguiente apartado). Existen otras lesiones cutáneas (no tumorales) que cursan con acantolisis, como son los pénfigos. El pénfigo es una enfermedad ampollar de la piel y mucosas que cursa con pérdida de adhesión intercelular, acantolisis epidérmica suprabasal y espongiosis intercelular (Payne y cols., 2004); estas alteraciones son debidas, al menos en parte, a un proceso autoinmune en el que se produce la unión de auto-anticuerpos a la superficie celular. En el caso del pénfigo vulgar, los auto-anticuerpos presentan afinidad por la molécula de adhesión desmogleína 3, interfiriendo gravemente las uniones intercelulares. Curiosamente, el fenotipo de los equivalentes de

piel H-IKK α , con espongiosis en la capa basal y primeras capas suprabasales, recuerda al pénfigo vulgar, lo que sugiere que IKK α puede estar implicada en el desarrollo de esta patología humana (figura 48). Sin embargo, en los equivalentes de piel no vemos acantolisis, lo cual podría ser debido a que en ellos no hay células inflamatorias. Estamos trabajando en el desarrollo de un modelo de piel en ratón, a partir de queratinocitos primarios humanos que expresan niveles elevados de IKK α , que nos permita una mejor modelización de esta enfermedad.

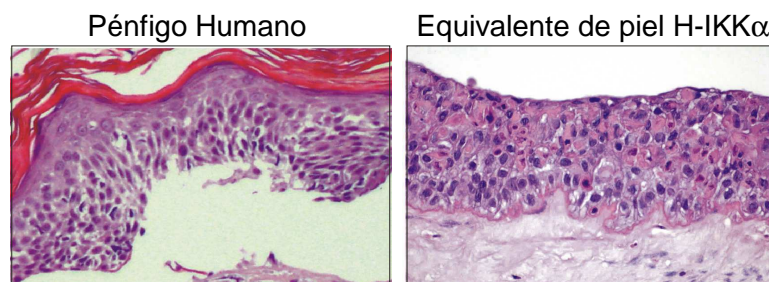


Figura 48. Aspecto de un pénfigo y de un equivalente de piel H-IKK α . Nótese la espongiosis en las capas basal y suprabasales inmediatas en ambos casos.

Diferentes estudios han puesto de manifiesto un papel central de placoglobina en el pénfigo vulgar, ya que, de forma secundaria a la unión de auto-anticuerpos, la presencia de placoglobina en la membrana plasmática induce la degradación de desmogleína 3, favoreciendo la evolución del proceso acantolítico (Caldelari y cols., 2001). Hemos analizado por inmunohistoquímica la expresión de placoglobina y hemos comprobado que los equivalentes H-Control presentan una tinción suprabasal homogénea, mientras que en los equivalentes de piel H-IKK α placoglobina se expresa de forma deslocalizada, acumulándose preferentemente en las células de las capas suprabasales intermedias (figura 49 C, D). Al analizar la tinción de placoglobina en los pénfigos comprobamos que, al igual que en el caso de los equivalentes piel H-IKK α , se expresa principalmente en las capas suprabasales intermedias (figura 49 A, B). Este hecho resulta muy llamativo y sugiere que la “rotura” de la epidermis en los pénfigos se podría producir por esa zona en la que se acumula placoglobina (figura 49-D). Estos resultados, aunque preliminares, nos hacen pensar que nuestra hipótesis sobre la relación entre las alteraciones en los niveles de expresión de IKK α en queratinocitos con el desarrollo del pénfigo tiene bastante consistencia. En cuanto al mecanismo por el que IKK α alteraría la expresión de placoglobina, podría ser similar al sistema de regulación propuesto para cadherina-E, a través de la acetilación del promotor de placoglobina mediante la función nuclear de IKK α , ya que se ha descrito que en la regulación de la expresión del gen *placoglobina* intervienen deacetilasas de histonas (Shim y cols., 2004).

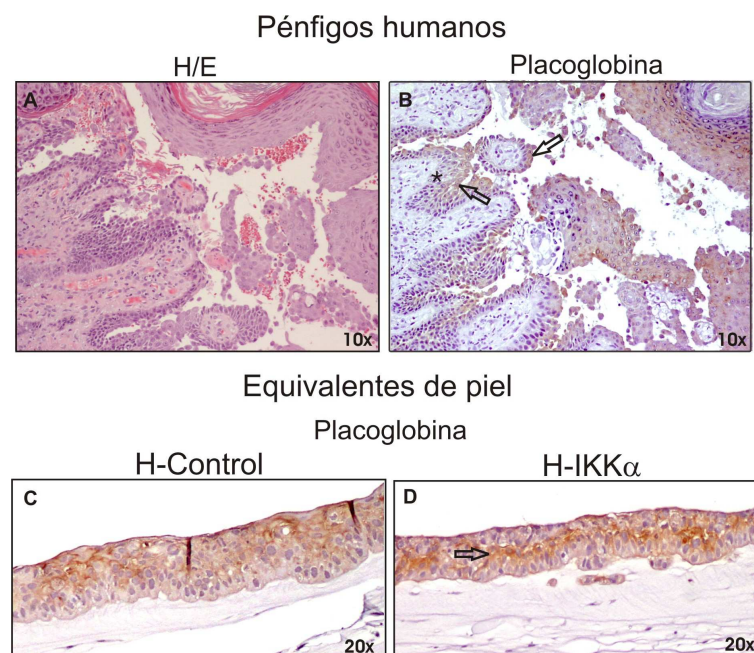


Figura 49. Expresión elevada de placoglobina en muestras de pénfigo humano. (A) H/E de una muestra de pénfigo vulgar. (B-D) Tinción inmunohistoquímica contra placoglobina en una muestra de pénfigo humano (B) y en equivalentes de piel H-Control y H-IKK α (C, D). En el pénfigo se observa una elevada expresión de placoglobina en las capas suprabasales próximas a la epidermis (B, flechas), mientras que la capa basal es negativa para esta tinción (B, asterisco). En los equivalentes H-IKK α la tinción se localiza en las capas suprabasales intermedias (D, flecha), mientras que en H-Control ésta es más homogénea (C).

El análisis de las líneas de ratones transgénicos K5-IKK α obtenidas no ha puesto de manifiesto alteraciones fenotípicas en estos animales. Esto puede ser debido a que la expresión de IKK α transgénica no alcanza niveles suficientemente elevados. Además, cuando intentamos conseguir una mayor expresión de IKK α , mediante la obtención de animales homocigotos para el transgén, no observamos diferencias en los niveles totales de expresión de IKK α entre animales transgénicos hemicigotos y homocigotos. Estos resultados hacen pensar que el nivel de expresión de IKK α *in vivo* puede estar sometido a una regulación muy estricta, de manera que no sea posible superar ciertos niveles de expresión. En este contexto, es llamativo también el hecho de que en la línea K5-IKK α -1 no hayamos obtenido, después de analizar 24 animales transgénicos procedentes de cruces entre machos y hembras hemicigotos, ningún animal homocigoto (cuando lo esperado, *a priori*, hubiera sido que un tercio de esos animales fueran homocigotos). Esto podría ser indicativo, de nuevo, de una hipotética limitación para que la expresión supere un determinado nivel. La diferente repercusión que tiene un incremento en los niveles de expresión de IKK α en las células HaCaT y en los queratinocitos de los ratones transgénicos podría ser debida a una mayor sensibilidad de los queratinocitos humanos a los cambios en los niveles de expresión de IKK α , ya que los niveles de expresión de IKK α en las células HaCaT tampoco son muy elevados (entre 3 y 5 veces el nivel endógeno). También podría deberse a influencias del resto del entorno de los

queratinocitos en el ratón, ya que en los experimentos de *knockout* de IKK α se ha observado también menor afectación de los queratinocitos cuando se encontraban formando parte de la epidermis que cuando se hacían estudios con los queratinocitos aislados (Gareus y cols., 2007). Los ratones K5-IKK α tampoco muestran cambios en los niveles de expresión de marcadores de diferenciación terminal, a diferencia de otros trabajos en los que se sugiere que el incremento en la expresión de IKK α en epidermis acelera la diferenciación terminal en piel (Liu y cols., 2006). Puede que las diferencias en ambos modelos radiquen en el promotor utilizado y el tipo celular al que se dirige la expresión del transgén. Así, mientras que en nuestro modelo la expresión del transgén está dirigida a células basales de la epidermis, en los estudios de Liu y cols. utilizan el promotor de la loricrina, con lo que la expresión del transgén está dirigida a las células suprabasales de la epidermis.

A pesar de no detectar alteraciones histológicas en la piel de los ratones transgénicos K5-IKK α , sí hemos encontrado diferencias en los ensayos de carcinogénesis química cutánea, aspecto que desarrollaremos más adelante, pero que nos indica que los niveles de sobreexpresión de IKK α conseguidos tienen consecuencias en situaciones patológicas.

La inhibición parcial de la expresión de IKK α , por la expresión de siRNAs específicos para esta proteína, ha puesto de manifiesto alteraciones tanto en la morfología como en el ciclo de crecimiento de los folículos pilosos. Nuestros estudios han revelado un retraso en la entrada de los folículos pilosos en el segundo anagén, así como degeneración en parte de los mismos. No obstante, este fenotipo no lo presentan todos los animales transgénicos, lo que podría ser debido a que no todas las células de la epidermis presenten el mismo nivel de interferencia, como se discutirá en un apartado posterior. También hemos observado pelos aberrantes (largos, finos y sin curvaturas) que no corresponden morfológicamente a ninguno de los 4 tipos de pelo que presenta el ratón –*guard*, *awl*, *auchene* y *zig-zag*–. Macroscópicamente, estas alteraciones se traducen en cambios en el aspecto del pelo durante las primeras semanas de vida de los animales transgénicos. Esto posiblemente sea debido a que, en esta época, el crecimiento del pelo es sincrónico; a partir del segundo telogén los folículos pilosos tienen un crecimiento asincrónico, por lo que el fenotipo puede verse enmascarado.

Nuestros resultados describen por primera vez una función de IKK α sobre la morfogénesis de los folículos pilosos y el ciclo de crecimiento del pelo. Hasta ahora no había sido posible conocerlo por el tipo de aproximaciones experimentales empleadas, ya que los ratones deficientes en IKK α mueren al poco tiempo de nacer. Aún así, se habían

realizado trasplantes de piel de ratones neonatos $IKK\alpha^{-/-}$ sobre ratones inmunodeficientes y se había observado la aparición de pelo en la zona trasplantada, así como desarrollo de una capa celular cornificada (Hu y cols., 2001). Las diferencias con nuestros resultados podrían deberse a que las anomalías en el desarrollo de los folículos, debidas a la ausencia de $IKK\alpha$ en los queratinocitos de los ratones *knockout*, sea compensada por la expresión de $IKK\alpha$ por parte de la piel normal (dermis y epidermis procedentes del ratón inmunodeficiente) que rodea a la piel $IKK\alpha^{-/-}$ trasplantada. Del mismo modo, en los ratones en los que se ha inactivado $IKK\alpha$ específicamente en los queratinocitos, el resto de las células sí expresan $IKK\alpha$ (Gareus y cols., 2007), por lo que, como en el caso anterior, podrían compensar la ausencia de $IKK\alpha$ en los queratinocitos. Sin embargo, en el modelo de ratones que hemos desarrollado en nuestro grupo, existe una deficiencia en la expresión de $IKK\alpha$ generalizada no limitada a los queratinocitos, de manera que presumiblemente la epidermis con niveles disminuidos de $IKK\alpha$ está sobre una dermis que también presenta bajos niveles de $IKK\alpha$.

Respecto al mecanismo por el que $IKK\alpha$ regula la morfogénesis de los folículos pilosos, y dado que $IKK\alpha$ regula la diferenciación de los queratinocitos por un mecanismo dependiente de cadherina-E, una posibilidad es que cadherina-E sea también importante para esta función de $IKK\alpha$. Por tanto, hemos analizado la expresión de cadherina-E en varios animales transgénicos respecto a sus hermanos control y hemos observado que, efectivamente, hay una disminución de la expresión de cadherina-E en los ratones transgénicos SUPER-1A-1 (no mostrado). Esta disminución en cadherina-E se acompaña por una disminución en los niveles de expresión de β -catenina en los ratones interferentes para $IKK\alpha$. Pensamos que quizá estos bajos niveles de cadherina-E y/o β -catenina sean responsables de las alteraciones observadas en los folículos pilosos de los ratones SUPER-1A-1, ya que se han descrito alteraciones en el desarrollo de folículos pilosos tanto en el *knockout* condicional de cadherina-E en piel –donde se produce una pérdida progresiva de folículos pilosos y alteraciones morfológicas en el tipo de pelo– (Young y cols., 2003), así como en ratones deficientes en β -catenina –donde su pérdida tiene un fuerte impacto sobre la morfogénesis folicular (estos ratones sufren una pérdida de los folículos pilosos durante el primer ciclo de crecimiento del pelo)– (Huelsken y cols., 2001).

Existe una enfermedad rara, denominada mal de Naxos, que se produce por una mutación en el gen *placoglobina*. Los pacientes afectados presentan pelo lanoso, queratoderma palmo-plantar y afecciones cardíacas. Una posibilidad interesante, ya que los ratones interferentes tienen pelo lanoso, folículos pilosos alterados y una expresión

disminuida de placoglobina (no mostrado), es que estos animales puedan representar un modelo de esta enfermedad. Se estudiará en detalle tanto la interferencia como posibles alteraciones fisiopatológicas en piel plantar de los ratones transgénicos SUPER-1A.

5.2 IKK α en la proliferación de los queratinocitos y la progresión de tumores de piel

Nuestros resultados muestran que el incremento en la expresión de IKK α en la línea de queratinocitos humanos HaCaT aumenta su capacidad proliferativa, lo que podría deberse al aumento observado en la expresión de β -catenina y ciclina D1 en las células H-IKK α . Se ha descrito que IKK α puede fosforilar y estabilizar a β -catenina, favoreciendo de este modo la expresión de genes como *ciclina D1* (uno de los reguladores principales del ciclo celular en su progresión hacia la fase proliferativa) (Sherr, 1996; Lamberti y cols., 2001; Albanese y cols., 2003). De forma recíproca al aumento en ciclina D1 como consecuencia de niveles elevados de expresión de IKK α , se ha descrito que MEFs derivados de ratones IKK $\alpha^{-/-}$ muestran niveles de expresión reducidos de ciclina D1 (Albanese y cols., 2003). Además, el alto potencial proliferativo que muestran las células H-IKK α (las cuales también sobreexpresan cadherina-E) es consistente con la disminución en la capacidad proliferativa de queratinocitos que expresan un dominante negativo para cadherina-E (Zhu y Watt, 1996) o que tienen reprimida su expresión por activación del factor represor Slug (Turner y cols., 2006).

El hecho de que las células H-IKK α atraviesen la membrana basal en los equivalentes de piel, así como su estratificación desordenada (displásica), podrían considerarse como indicios de malignidad celular. Diversos estudios han puesto de manifiesto la implicación de IKK α en la tumorigénesis epitelial, aunque no queda claro si actúa como promotor o supresor del desarrollo tumoral, ya que existen en la literatura resultados contrapuestos; unos trabajos sugieren que IKK α puede considerarse como supresor tumoral (Liu y cols., 2006; Park y cols., 2007) y otros que puede actuar como promotor de malignidad tumoral y de metástasis (Nakayama y cols., 2005; Luo y cols., 2007). En nuestro modelo de equivalentes de piel, IKK α favorece un crecimiento invasivo que podría estar asociado al aumento en la expresión de MMP-9 y a la elevada actividad metaloproteasa detectada en el medio de cultivo de los equivalentes H-IKK α . Se ha descrito que la expresión de Snail está asociada con un incremento en la expresión de genes de la matriz extracelular, entre ellos de MMP-9 (Jorda y cols., 2005). Dado que tanto en los cultivos convencionales en monocapa como en los equivalentes de piel de las células H-IKK α encontramos inducida la expresión de Snail, ésta podría ser la causa del

aumento en los niveles de metaloproteasas y, en último término, de la invasividad de los equivalentes H-IKK α . El hecho de que IKK α , en el modelo de equivalentes de piel, induzca la capacidad invasiva de las células HaCaT, viene también apoyado por los resultados del análisis del patrón de expresión génica por *microarrays*, ya que hemos encontrado inducidos genes que participan en fenómenos invasivos, como *twist1* (Yang y cols., 2004) y *podoplanina* (del que hemos comprobado también su inducción por *Western blot*) (Wicki y cols., 2006), en los equivalentes de piel H-IKK α .

En concordancia con estos resultados, los experimentos de carcinogénesis química en piel en ratones K5-IKK α , y de inyección subcutánea de las células C57-IKK α en ratones inmunodeficientes, muestran que el incremento en los niveles de expresión de IKK α induce cambios en el fenotipo tumoral asociado a un peor pronóstico de los mismos. Así, hemos observado que los tumores desarrollados por los ratones K5-IKK α presentan en unos casos displasia severa y nidos infiltrantes en otros. En la carcinogénesis en ratones inmunodeficientes con las células C57-IKK α , IKK α aparece como responsable de la formación de una variante de SCC, el SCC acantolítico o pseudoglandular, con un comportamiento más agresivo y mayor probabilidad de metastatizar que los SCCs convencionales que presentan los animales control (Johnson y Helwig, 1966; Nappi y cols., 1989).

Se ha descrito que ratones transgénicos que expresan un transgén para IKK α bajo el promotor de loricrina (que dirige la expresión a las células suprabasales de la epidermis) dan lugar a SCCs más diferenciados y con menor capacidad invasiva que los desarrollados por los animales control, sin diferenciación hacia un fenotipo acantolítico (Liu y cols., 2006). La discrepancia entre estos resultados y los obtenidos por nosotros en los ratones K5-IKK α (en los que hemos observado características tumorales de peor pronóstico que en los ratones control), puede ser debida a haber utilizado promotores diferentes en cada caso. Así, mientras que en un caso la expresión del transgén está dirigida a células suprabasales de la epidermis, que en su mayor parte ya no se dividen, en el nuestro está dirigida a las células basales, proliferativas. En este sentido, es sabido que el tipo de tumor obtenido cuando se induce carcinogénesis en piel por la expresión de un determinado transgén, depende del tipo celular al que va dirigida dicha expresión (Brown y cols., 1998).

Recientemente se ha publicado que los ratones heterocigotos para la delección del gen *Ikk α* (IKK α ^{+/-}) desarrollan más tumores y de mayor tamaño que los ratones IKK α ^{+/+} (Park y cols., 2007). Estos resultados contrastan de nuevo con el peor pronóstico tumoral observado en los ensayos de carcinogénesis en ratones transgénicos K5-IKK α . Sin

embargo, los dos modelos que se discuten presentan claras diferencias que podrían explicar las discrepancias en un caso y otro. Así, mientras que en los ratones $IKK\alpha^{+/-}$ existe una disminución de $IKK\alpha$ en todos los tipos celulares (teóricamente del 50%), en nuestro modelo la alteración en los niveles de expresión de $IKK\alpha$ se limita a los queratinocitos. Es muy probable que el efecto sobre el desarrollo tumoral de la disminución de la expresión de $IKK\alpha$ específicamente en queratinocitos fuese diferente al resultado obtenido por estos autores. Esta conjetura está apoyada por las evidencias que muestran que las alteraciones que se producen en la morfogénesis epidérmica en animales con ausencia total de $IKK\alpha$ (Hu y cols., 1999; Li y cols., 1999a; Takeda y cols., 1999) son diferentes a las que se observan cuando la deficiencia de $IKK\alpha$ se reduce a células de la epidermis (Gareus y cols., 2007).

Se ha descrito que la expresión de $IKK\alpha$ está disminuida en SCCs humanos indiferenciados, bien por mutaciones en el gen *Ikk α* (Liu y cols., 2006) o bien debido a su regulación negativa a través de vías alternativas –por ejemplo, se ha publicado que p63 regula la expresión de $IKK\alpha$ durante el desarrollo de la epidermis y que alteraciones en la expresión de p63 están implicadas en el desarrollo de tumores de piel (Koster y cols., 2006; Koster y cols., 2007)–. Por tanto, este dato sugiere que la expresión de $IKK\alpha$ es importante en el desarrollo tumoral y que $IKK\alpha$ puede actuar como supresor tumoral. Sin embargo, nuestros resultados muestran que existen otros tumores humanos, los SCCs acantolíticos o pseudoglandulares, de gran agresividad y que expresan niveles elevados de $IKK\alpha$. Además, hemos demostrado que en células tumorales epidérmicas que portan una mutación en *Ha-ras*, el aumento en la expresión de $IKK\alpha$ induce un cambio en la variante fenotípica de los SCCs que resultan de la inyección de estas células en ratones inmunodeficientes, dando lugar a la aparición de tumores pseudoglandulares semejantes a los ASCCs humanos. Otros autores han encontrado también un aumento en la malignidad o capacidad metastásica tumoral de células tumorales por el incremento en la expresión de $IKK\alpha$ (Nakayama y cols., 2005). Una explicación de estos resultados, aparentemente contradictorios, podría ser que el efecto de $IKK\alpha$ sobre la progresión tumoral tuviese relación con el momento en el que se produce el incremento en los niveles de expresión de $IKK\alpha$. De este modo, si el incremento en $IKK\alpha$ ocurriese en células en las que no se hubiese producido otra mutación previa, $IKK\alpha$ actuaría como supresor tumoral; por el contrario, si ocurriese en células ya tumorales $IKK\alpha$ actuaría como promotor de malignidad. Un papel dual en la promoción tumoral ha sido previamente descrito para otras moléculas como NF- κ B, para la que se ha descrito que en los primeros estadios tumorales actúa como inhibidor del crecimiento tumoral, mientras

que en los estadios avanzados se desencadena su acción oncogénica, contribuyendo activamente a la progresión tumoral (Perkins, 2004).

La incidencia de neoplasias cutáneas tanto benignas como malignas está aumentando de forma alarmante en los últimos años. El cáncer de piel no-melanoma (BCCs y SCCs) es uno de los más comunes en humanos y representa la gran mayoría de los tumores diagnosticados (Limmer, 2001). Se han descrito diversas variantes dentro de los SCCs con diferencias en su comportamiento clínico (desde SCCs poco tumorigénicos hasta tumores agresivos con alto potencial metastático), por lo que el diagnóstico diferencial del tipo de SCC es clave para la elección del correcto tratamiento de los mismos. El conocimiento de los mecanismos implicados en el origen de las diferentes variantes es limitado. De acuerdo con nuestros resultados, IKK α parece ser responsable de una de las variantes de SCCs, el SCC acantolítico o pseudoglandular. En humanos, los ASCCs tienen un comportamiento más agresivo y mayor probabilidad de metastatizar que los SCCs convencionales (Johnson y Helwig, 1966; Nappi y cols., 1989). A pesar de ello, se conoce muy poco acerca de su etiología o de las proteínas marcadoras que los caracterizan. Nuestros estudios indican que los ASCCs humanos expresan altos niveles tanto de IKK α como de cadherina-E en ausencia de las queratinas K10 y K1, lo cual resulta llamativo, porque hasta ahora se había asociado una expresión elevada de cadherina-E (Batlle y cols., 2000; Cano y cols., 2000) y de IKK α (Liu y cols., 2006) con SCCs bien diferenciados y por tanto tumores que mantienen la expresión de las queratinas K1 y K10 (marcadores de diferenciación). Estos resultados son potencialmente muy importantes en términos de pronóstico y tratamiento terapéutico de diferentes tipos de neoplasias epiteliales, ya que, dependiendo del tipo de variante tumoral, la terapia indicada es diferente en cada caso.

Se ha postulado recientemente que los animales deficientes en p120-catenina presentan un bloqueo en el desarrollo de células acinares en las glándulas salivares debido a la disminución en la expresión de cadherina-E (Davis y Reynolds, 2006). También se ha descrito que cadherina-E está implicada en el desarrollo de otras glándulas como la tiroidea (Cali y cols., 2007). De esta manera, es razonable pensar que la diferenciación pseudoglandular observada en los tumores C57-IKK α sea provocada por el notable incremento que presentan en la expresión de cadherina-E. Además, se ha visto que cadherina-E está incrementada en la variante *in situ* de los tumores ASCC, siendo su expresión preferentemente citosólica en las áreas acantolíticas (Bayer-Garner y Smoller, 2001).

Pese a que se han descrito alteraciones en el complejo IKK y en la vía de señalización NF- κ B que conducen al desarrollo de SCCs y papilomas, tanto en ratón como en humanos (van Hogerlinden y cols., 1999; Dajee y cols., 2003; Nakayama y cols., 2005; Kobiela y Fuchs, 2006; Liu y cols., 2006), esta es la primera vez que se describe un cambio en el fenotipo tumoral inducido por la alteración en la expresión de una de las subunidades del complejo IKK.

5.3 Interferencia de ARN en animales transgénicos

La interferencia de ARN es un mecanismo alternativo a la inactivación de genes por recombinación homóloga en células ES para la obtención de modelos animales con niveles disminuidos para una proteína dada. Con esta metodología, y dependiendo de los niveles de interferencia conseguidos, pueden generarse líneas con niveles de expresión intermedios entre los que presentan los individuos wt (100 % de expresión) y los individuos portadores de alelos nulos por recombinación homóloga (0 ó 50 % de expresión, según porten la mutación en homocigosis o en hemicigosis) (Hemann y cols., 2003). Otras ventajas adicionales de la inhibición de la expresión por interferencia de ARN en individuos son su relativa sencillez y rapidez (en comparación con la inactivación por recombinación homóloga), así como el ser una metodología aplicable a otras especies de mamíferos diferentes al ratón, por no necesitarse células ES. Pese al potencial de esta tecnología, faltan en la literatura estudios donde se analicen con detalle y se comparen la aplicabilidad y eficacia de las distintas aproximaciones que pueden utilizarse para disminuir los niveles de expresión de la proteína objeto de estudio en modelos animales (introducción de la construcción de interferencia por medio de vectores lentivirales, microinyección pronuclear de las construcciones de interferencia, uso de vectores dependientes de ARN Pol II o ARN Pol III, aplicación de sistemas inducibles y reversibles de interferencia, etc.).

Hemos estudiado en animales transgénicos generados por microinyección pronuclear las características de vectores de interferencia derivados del plásmido pSUPER, ampliamente utilizado en sistemas celulares *in vitro* (Brummelkamp y cols., 2002); este plásmido contiene el promotor humano H1, cuya transcripción es dependiente de ARN Pol III. Para ello, hemos analizado en varias líneas de animales transgénicos la expresión de siRNAs así como el nivel de interferencia conseguido en distintos tejidos.

Nuestros datos indican que, al igual que se estableció hace más de dos décadas para construcciones dependientes de ARN Pol II (Palmiter y Brinster, 1986), es conveniente que el transgén esté libre de secuencias plasmídicas para conseguir alta expresión al usar vectores dependientes de ARN Pol III; al comparar los niveles de expresión conseguidos con la misma construcción cuando se inyecta libre de secuencias procarióticas (lo que hemos denominado fragmento A) o acompañada del esqueleto plasmídico (lo que hemos denominado fragmento B), hemos encontrado mayores niveles de expresión en las líneas transgénicas portadoras del fragmento A, aunque *a priori* no nos hubiera resultado sorprendente que, debido a lo compacto de estas construcciones (la versión empleada del promotor H1 mide tan solo 250 pb y el ADN a transcribir es de 64 pb), se produjera silenciamiento de las mismas al haber múltiples copias repetidas en tándem. Es interesante destacar que no es necesaria la presencia de elementos génicos adicionales que lo aíslan del entorno cromosómico en el que se haya integrado para que estas construcciones sean transcritas, aunque sería interesante comprobar el efecto que puedan tener elementos tipo *insulator* (Gaszner y Felsenfeld, 2006) sobre la expresión de construcciones derivadas de pSUPER como las que aquí hemos utilizado (posiblemente se consiguieran de esta manera niveles de expresión mayores).

Aunque se han publicado diversos estudios en los que analizan ratones transgénicos que expresan siRNAs, dirigidos por promotores de la ARN Pol III (H1 y U6), y que inhiben la expresión de GFP o genes endógenos del ratón con gran eficiencia (Hasuwa y cols., 2002; Robinson y cols., 2003; Tiscornia y cols., 2003), hay aspectos interesantes acerca de la expresión del transgén que no se han descrito como por ejemplo el patrón de expresión de estos transgenes, que se supone ubicuo por los datos obtenidos en células en cultivo, o el estudio comparativo de los niveles de expresión e inhibición en diferentes tejidos. Nuestros resultados indican que la expresión del transgén dirigida por el promotor H1 puede considerarse ubicua –al menos para los tejidos y órganos analizados–, aunque los niveles de expresión del ARN de interferencia es distinto en diferentes tejidos, presentando variaciones de hasta un orden de magnitud entre hígado y cerebro; es interesante señalar que estas variaciones no son reflejo de diferencias de actividad del gen endógeno H1, ya que al analizar su actividad, aunque hemos encontrado diferencias de expresión, éstas no son tan grandes ni guardan correspondencia con lo observado para la expresión del transgén. Nuestros resultados también ponen de manifiesto de forma clara que estos transgenes están sometidos a efectos de posición, ya que los patrones de expresión no son equivalentes en todas las líneas ni el nivel de expresión es proporcional al número de copias. Este es otro aspecto que quizá pueda ser mejorado con la adición de secuencias que aíslan la expresión del transgén (*insulator*) de la influencia de la cromatina circundante.

En los ratones transgénicos que hemos generado, se observa una disminución en la expresión de IKK α de aproximadamente el 60% en diferentes tejidos. Resulta sorprendente que ni todos los ratones transgénicos analizados tienen inhibida la expresión de IKK α en un tejido dado, ni todos los animales con inhibición de la expresión en un tejido presentan necesariamente inhibición en los demás; este fenómeno ha sido descrito también en otras líneas de animales transgénicos con construcciones conteniendo los promotores H1 o U6 (Cao y cols., 2005; Oberdoerffer y cols., 2005), lo que complica el análisis de los mismos. Esta variabilidad en los niveles de interferencia entre diferentes tejidos y animales puede ser reflejo de que la eficiencia de la interferencia de ARN esté determinada no sólo por los niveles de expresión del ARN mensajero del gen a inhibir y del ARN interferente (que a su vez pueden ser variables en el tiempo o en el espacio), sino también por otros factores no conocidos (diferencias en el fondo genético de los individuos o en la disponibilidad de otras proteínas necesarias en el proceso de interferencia génica, por ejemplo).

La utilidad de esta aproximación para profundizar en el conocimiento de las funciones de las proteínas objeto de estudio viene avalada por el hecho de que parte de los animales transgénicos para la construcción pSUPER-1 muestren alteraciones fenotípicas en un porcentaje de los folículos pilosos. Sería interesante conocer si en animales con mayores niveles de expresión del ARN de interferencia (mediante la generación de transgénicos homocigotos o de animales portadores de varias de las integraciones del transgén obtenidas en las diferentes líneas de transgénicos), se ven incrementados los fenotipos observados en ratones hemicigotos de la línea pSUPER-1A-1. El estudio de estos animales podría poner de manifiesto implicaciones funcionales de IKK α que hasta ahora no se han revelado en los modelos de sobreexpresión, *knockout* totales y *knockout* específicos de tejido para IKK α generados hasta el momento.

5.4 Función de CYLD sobre las propiedades tumorigénicas de células epidérmicas y de SCCs

Aunque se desconoce el papel que desempeña *CYLD* en la morfogénesis epidérmica, se ha establecido su implicación en el desarrollo de tumores benignos de la piel tanto en humanos como en modelos murinos (Bignell y cols., 2000; Massoumi y cols., 2006). Estos estudios describen el papel de *CYLD* en células no tumorales, heterocigotas para una mutación en *CYLD* y en las que la pérdida del alelo wt induce el crecimiento de formas neoplásicas benignas. En el presente trabajo nos hemos planteado conocer las consecuencias que tendría una mutación en *CYLD* en células que previamente han sufrido una mutación que las hace tumorales (en el caso de las células

PDVC57, en el gen *Ha-ras*). Nuestros estudios indican que la expresión de una forma mutante de CYLD, que actúa como dominante negativo de la forma salvaje y se encuentra en algunos pacientes de cilindromatosis hereditaria, incrementa el potencial proliferativo de células epidérmicas tumorales, además de su capacidad de crecer en suspensión. Esta forma mutada acelera también el crecimiento y aumenta la agresividad de los SCCs inducidos en ratones inmunodeficientes.

Nuestros resultados establecen que la expresión de la forma mutada de CYLD induce la expresión de los factores angiogénicos VEGF y trombospondinas (Tsp) 1 y 2 en células tumorales y no tumorales. El incremento en la expresión de estas proteínas explicaría la mayor capacidad de crecimiento en suspensión que presentan las células C57-CYLD-mut, ya que se ha descrito que VEGF incrementa la viabilidad de las células en cultivos en suspensión (Solovey y cols., 1999). Recientemente se ha encontrado que además de su función angiogénica, Tsp 1 y 2 pueden estar implicadas en la modulación de las interacciones célula-matriz extracelular (Bornstein y cols., 2004), lo que podría favorecer también la adhesión al sustrato observada en las células C57-CYLD-mut. El hecho de que no se detecte un gran incremento en los niveles de expresión de VEGF (por *Northern blot*) en los tumores PB-CYLD-mut podría ser debido al elevado grado de degeneración y necrosis que se encuentra en estos SCCs. Tsp 1 y 2 son generalmente consideradas como proteínas antiangiogénicas, sin embargo también se ha descrito que pueden estimular el proceso angiogénico (Esemuede y cols., 2004). Además, se piensa que Tsp 1 tiene un papel importante tanto en la promoción como en la inhibición de la progresión tumoral dependiendo del tipo de tumor (modulando el crecimiento, la adhesión y la invasión celular) (Esemuede y cols., 2004). Al ser los tumores PB-CYLD-mut más agresivos y de crecimiento más rápido, es posible que Tsp 1 y 2 estén actuando en ellos como inductores de la progresión tumoral.

El análisis de los tumores también ha puesto de manifiesto la presencia de abundante infiltrado inflamatorio (células polimorfonucleadas) en los tumores PB-CYLD-mut. Pensamos que este incremento podría ser secundario al proceso degenerativo y necrótico que sufren estos tumores, aunque no hemos descartado otras posibles causas. Se ha descrito que un ambiente inflamatorio fomenta los procesos angiogénicos y por otra parte, una angiogénesis robusta sostiene una inflamación crónica (Nelson y Ganss, 2006; Ruegg, 2006). El resultado final de una angiogénesis e inflamación elevadas, como presentan los tumores PB-CYLD-mut, es un rápido crecimiento de los tumores y un agravamiento del fenotipo tumoral.

Se ha sugerido que la pérdida de actividad de CYLD produce una señalización persistente de NF- κ B (p65/p50) que contribuye al crecimiento celular aberrante y a la

aparición de tumores, en parte causados por una mayor resistencia a la apoptosis (Brummelkamp y cols., 2003). Sin embargo, se ha descrito que ratones con expresión constitutiva de p65 y p50 en queratinocitos presentan hipoplasia epidérmica e inhibición de crecimiento (Seitz y cols., 1998). Estos resultados sugieren la posibilidad de que otras vías de señalización adicionales a NF- κ B puedan estar afectadas en células tumorales deficientes en CYLD. En nuestro caso no hemos observado diferencias ni en la activación de la vía clásica de señalización de NF- κ B ni en la tasa de apoptosis de células en cultivo que expresan un dominante negativo de CYLD, lo que coincide con los estudios realizados en queratinocitos de ratones deficientes en CYLD (Massoumi y cols., 2006). Nuestros datos sugieren que el efecto de CYLD sobre las células epidérmicas tumorales no es debido a la señalización por la vía de NF- κ B sino a la regulación de la angiogénesis (inducción de la expresión de los factores angiogénicos VEGF, Tsp 1 y Tsp 2). Está ampliamente demostrado que el desarrollo de los primeros estadios tumorales (incluidos los tumores de piel) está precedido de una “explosión” angiogénica y que a medida que el tumor progresa se va estableciendo una red de vasos inmaduros y permeables (Bolontrade y cols., 1998). VEGF desempeña un papel esencial en estos procesos (Zhang y cols., 1995). Por tanto, la inducción de VEGF que se observa en las células epidérmicas por expresión de la forma dominante negativa de CYLD podría predisponer para el desarrollo de una red de vasos más eficientes para la progresión tumoral, como lo demuestran los experimentos de permeabilidad capilar en los tumores PB-CYLD-mut, así como su rápido crecimiento y el gran tamaño que alcanzan.

Aunque mutaciones en CYLD son responsables de la aparición de tumores benignos de piel, se han descrito casos en que éstos metastatizan (Gerretsen y cols., 1995). De acuerdo con los resultados obtenidos en nuestro estudio, que revelan un papel de CYLD como promotor de la malignidad tumoral cuando hay alteraciones previas a la mutación producida en el gen *CYLD*, podría ser que, en esos casos de malignización de los cilindromas, la pérdida del alelo *CYLD* wt se hubiese producido cuando ya existiesen otras mutaciones previas en esas células.

Todos estos resultados aportan datos relevantes acerca de la importancia de *CYLD* como supresor de la malignidad tumoral, ya que la forma mutante empleada en este estudio actúa como dominante negativo, interfiriendo con la función de la proteína CYLD wt. Finalmente, se ha visto que los niveles de CYLD están disminuidos en otros tipos de tumores, como por ejemplo en tumores de riñón o hígado (Strobel y cols., 2002; Hashimoto y cols., 2004), lo cual sugiere que, además de la función descrita en tumores de piel, CYLD juegue un papel más general como supresor tumoral, de acuerdo con su patrón de expresión ubicuo.

6 CONCLUSIONES

1. IKK α promueve la diferenciación de los queratinocitos por un mecanismo dependiente de cadherina-E.
2. El estudio del patrón de expresión génica en equivalentes de piel por *microarrays* pone de manifiesto la inducción de genes implicados en la formación de la envuelta córnea y en el proceso de descamación y confirma la implicación de IKK α en el desarrollo y la diferenciación epidérmica, así como en el establecimiento de la función barrera en la epidermis. Además, sugiere que IKK α puede desempeñar un papel relevante en patologías cutáneas que impliquen alteraciones en la envuelta córnea.
3. Es posible la aplicación de técnicas clásicas de transgénesis por inyección pronuclear para la inhibición de la expresión génica por interferencia de ARN utilizando construcciones con promotores dependientes de la ARN Pol III para su transcripción. Los niveles de inhibición observados son variables, existiendo diferencias considerables entre distintos animales y distintos tejidos.
4. La interferencia de IKK α en ratones transgénicos produce alteraciones en folículos pilosos y en el pelo y sugiere por primera vez una posible función de IKK α sobre su fisiología, complementaria a su función en la diferenciación de los queratinocitos. Estas alteraciones fenotípicas causadas por la inhibición parcial de la expresión de IKK α confirman la utilidad de la interferencia de ARN *in vivo* para profundizar en el conocimiento de una proteína objeto de estudio.
5. IKK α incrementa la proliferación celular de queratinocitos en cultivos convencionales en monocapa y promueve actividades proteolíticas y la invasión de los queratinocitos en equivalentes de piel. El aumento en los niveles de expresión de IKK α induce también un peor pronóstico de los tumores originados en los diversos estudios realizados de carcinogénesis epitelial. Estos datos sugieren un papel de IKK α como promotor de malignidad tumoral.

6. IKK α es responsable de la aparición de una de las variantes de SCCs, el SCC acantolítico o pseudoglandular, que presenta un comportamiento más agresivo que los SCCs convencionales. Estos tumores cursan con una elevada expresión de IKK α y cadherina-E, asociada a una disminución de queratinas K1 y K10. Este patrón de expresión podría ser útil en el diagnóstico diferencial de esta variante tumoral. Nuestros resultados sugieren también la posible implicación de IKK α en otras patologías no tumorales que cursen con acantolisis, como el pénfigo vulgar.

7. La expresión de una forma mutante (dominante negativa) de CYLD, presente en algunos pacientes de cilindromatosis familiar y que interfiere con la función de CYLD wt, incrementa las propiedades tumorigénicas de células en cultivo, así como su capacidad de sobrevivir en suspensión. Del mismo modo, su expresión aumenta la agresividad de los tumores de piel inducidos en ratones inmunodeficientes, lo que apoya la idea de que CYLD se comporta en piel como supresor de la malignidad tumoral.

8. Nuestros datos sugieren que el dominante negativo de CYLD incrementa las propiedades tumorigénicas de células en cultivo y de SCCs por un mecanismo independiente de la vía clásica de NF- κ B, probablemente por inducción de la expresión de factores angiogénicos como VEGF y trombospondinas 1 y 2.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Malek, Z.A., A.L. Kadekaro, M.A. Pipitone, D.F. Mutasim 2005. Skin Cancer: Epidemiology, Clinical Manifestations, and Genetic and Molecular Aspects. *In* Molecular carcinogenesis and the molecular biology of human cancer. D. Warshawsky, J.R. Landolph editor. CRC Press.
- Aggarwal, B.B. 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol.* 3:745-56.
- Aguilera, C., R. Hoya-Arias, G. Haegeman, L. Espinosa, and A. Bigas. 2004. Recruitment of IkappaBalpha to the hes1 promoter is associated with transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:16537-42. Epub 2004 Nov 9.
- Albanese, C., K. Wu, M. D'Amico, C. Jarrett, D. Joyce, J. Hughes, J. Hulit, T. Sakamaki, M. Fu, A. Ben-Ze'ev, J.F. Bromberg, C. Lamberti, U. Verma, R.B. Gaynor, S.W. Byers, and R.G. Pestell. 2003. IKKalpha regulates mitogenic signaling through transcriptional induction of cyclin D1 via Tcf. *Mol Biol Cell.* 14:585-99.
- Alonso, L., and E. Fuchs. 2003. Stem cells in the skin: waste not, Wnt not. *Genes Dev.* 17:1189-200.
- Alonso, L., and E. Fuchs. 2006. The hair cycle. *J Cell Sci.* 119:391-3.
- Anest, V., J.L. Hanson, P.C. Cogswell, K.A. Steinbrecher, B.D. Strahl, and A.S. Baldwin. 2003. A nucleosomal function for IkappaB kinase-alpha in NF-kappaB-dependent gene expression. *Nature.* 423:659-63.
- Barkett, M., and T.D. Gilmore. 1999. Control of apoptosis by Rel/NF-kappaB transcription factors. *Oncogene.* 18:6910-24.
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell.* 116:281-97.
- Barton, G.M., and R. Medzhitov. 2003. Toll-like receptor signaling pathways. *Science.* 300:1524-5.
- Battle, E., E. Sancho, C. Franci, D. Dominguez, M. Monfar, J. Baulida, and A. Garcia De Herreros. 2000. The transcription factor snail is a repressor of E-cadherin gene expression in epithelial tumour cells. *Nat Cell Biol.* 2:84-9.
- Bayer-Garner, I.B., and B.R. Smoller. 2001. The expression of syndecan-1 is preferentially reduced compared with that of E-cadherin in acantholytic squamous cell carcinoma. *J Cutan Pathol.* 28:83-9.
- Bell, S., K. Degitz, M. Quirling, N. Jilg, S. Page, and K. Brand. 2003. Involvement of NF-kappaB signalling in skin physiology and disease. *Cell Signal.* 15:1-7.

- Ben-Neriah, Y. 2002. Regulatory functions of ubiquitination in the immune system. *Nat Immunol.* 3:20-6.
- Bernstein, E., A.A. Caudy, S.M. Hammond, and G.J. Hannon. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 409:363-6.
- Berx, G., K.F. Becker, H. Hofler, and F. van Roy. 1998. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat.* 12:226-37.
- Bianchi, A.B., C.M. Aldaz, and C.J. Conti. 1990. Nonrandom duplication of the chromosome bearing a mutated Ha-ras-1 allele in mouse skin tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:6902-6.
- Biggs, P.J., P. Chapman, S.R. Lakhani, J. Burn, and M.R. Stratton. 1996. The cylindromatosis gene (cyld1) on chromosome 16q may be the only tumour suppressor gene involved in the development of cylindromas. *Oncogene.* 12:1375-7.
- Biggs, P.J., R. Wooster, D. Ford, P. Chapman, J. Mangion, Y. Quirk, D.F. Easton, J. Burn, and M.R. Stratton. 1995. Familial cylindromatosis (turban tumour syndrome) gene localised to chromosome 16q12-q13: evidence for its role as a tumour suppressor gene. *Nat Genet.* 11:441-3.
- Bignell, G.R., W. Warren, S. Seal, M. Takahashi, E. Rapley, R. Barfoot, H. Green, C. Brown, P.J. Biggs, S.R. Lakhani, C. Jones, J. Hansen, E. Blair, B. Hofmann, R. Siebert, G. Turner, D.G. Evans, C. Schrander-Stumpel, F.A. Beemer, A. van Den Ouweland, D. Halley, B. Delpech, M.G. Cleveland, I. Leigh, J. Leisti, and S. Rasmussen. 2000. Identification of the familial cylindromatosis tumour-suppressor gene. *Nat Genet.* 25:160-5.
- Birchmeier, W., and J. Behrens. 1994. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta.* 1198:11-26.
- Blazquez, C., M.L. Casanova, A. Planas, T.G. Del Pulgar, C. Villanueva, M.J. Fernandez-Acenero, J. Aragonés, J.W. Huffman, J.L. Jorcano, and M. Guzman. 2003. Inhibition of tumor angiogenesis by cannabinoids. *Faseb J.* 17:529-31.
- Bolontrade, M.F., M.C. Stern, R.L. Binder, J.C. Zenklusen, I.B. Gimenez-Conti, and C.J. Conti. 1998. Angiogenesis is an early event in the development of chemically induced skin tumors. *Carcinogenesis.* 19:2107-13.
- Bonizzi, G., and M. Karin. 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends Immunol.* 25:280-8.

- Bornstein, P., A. Agah, and T.R. Kyriakides. 2004. The role of thrombospondins 1 and 2 in the regulation of cell-matrix interactions, collagen fibril formation, and the response to injury. *Int J Biochem Cell Biol.* 36:1115-25.
- Botchkarev, V.A. 2003. Bone morphogenetic proteins and their antagonists in skin and hair follicle biology. *J Invest Dermatol.* 120:36-47.
- Boukamp, P., R.T. Petrussevska, D. Breitkreutz, J. Hornung, A. Markham, and N.E. Fusenig. 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol.* 106:761-71.
- Bowen, S., M. Gill, D.A. Lee, G. Fisher, R.G. Geronemus, M.E. Vazquez, and J.T. Celebi. 2005. Mutations in the CYLD gene in Brooke-Spiegler syndrome, familial cylindromatosis, and multiple familial trichoepithelioma: lack of genotype-phenotype correlation. *J Invest Dermatol.* 124:919-20.
- Bremner, R., and A. Balmain. 1990. Genetic changes in skin tumor progression: correlation between presence of a mutant ras gene and loss of heterozygosity on mouse chromosome 7. *Cell.* 61:407-17.
- Broome, A.M., D. Ryan, and R.L. Eckert. 2003. S100 protein subcellular localization during epidermal differentiation and psoriasis. *J Histochem Cytochem.* 51:675-85.
- Brown, K., M. Quintanilla, M. Ramsden, I.B. Kerr, S. Young, and A. Balmain. 1986. v-ras genes from Harvey and BALB murine sarcoma viruses can act as initiators of two-stage mouse skin carcinogenesis. *Cell.* 46:447-56.
- Brown, K., D. Strathdee, S. Bryson, W. Lambie, and A. Balmain. 1998. The malignant capacity of skin tumours induced by expression of a mutant H-ras transgene depends on the cell type targeted. *Curr Biol.* 8:516-24.
- Brummelkamp, T.R., R. Bernards, and R. Agami. 2002. A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science.* 296:550-3.
- Brummelkamp, T.R., S.M. Nijman, A.M. Dirac, and R. Bernards. 2003. Loss of the cylindromatosis tumour suppressor inhibits apoptosis by activating NF-kappaB. *Nature.* 424:797-801.
- Budunova, I.V., P. Perez, V.R. Vaden, V.S. Spiegelman, T.J. Slaga, and J.L. Jorcano. 1999. Increased expression of p50-NF-kappaB and constitutive activation of NF-kappaB transcription factors during mouse skin carcinogenesis. *Oncogene.* 18:7423-31.
- Caldelari, R., A. de Bruin, D. Baumann, M.M. Suter, C. Bierkamp, V. Balmer, and E. Muller. 2001. A central role for the armadillo protein plakoglobin in the autoimmune disease pemphigus vulgaris. *J Cell Biol.* 153:823-34.

- Cali, G., M. Zannini, P. Rubini, C. Tacchetti, B. D'Andrea, A. Affuso, T. Wintermantel, O. Boussadia, D. Terracciano, D. Silberschmidt, E. Amendola, M. De Felice, G. Schutz, R. Kemler, R. Di Lauro, and L. Nitsch. 2007. Conditional inactivation of the E-cadherin gene in thyroid follicular cells affects gland development but does not impair junction formation. *Endocrinology*. 148:2737-46.
- Cano, A., M.A. Perez-Moreno, I. Rodrigo, A. Locascio, M.J. Blanco, M.G. del Barrio, F. Portillo, and M.A. Nieto. 2000. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2:76-83.
- Cao, W., R. Hunter, D. Strnatka, C.A. McQueen, and R.P. Erickson. 2005. DNA constructs designed to produce short hairpin, interfering RNAs in transgenic mice sometimes show early lethality and an interferon response. *J Appl Genet*. 46:217-25.
- Cao, Y., G. Bonizzi, T.N. Seagroves, F.R. Greten, R. Johnson, E.V. Schmidt, and M. Karin. 2001. IKKalpha provides an essential link between RANK signaling and cyclin D1 expression during mammary gland development. *Cell*. 107:763-75.
- Carayol, N., and C.Y. Wang. 2006. IKKalpha stabilizes cytosolic beta-catenin by inhibiting both canonical and non-canonical degradation pathways. *Cell Signal*. 18:1941-6.
- Carmell, M.A., L. Zhang, D.S. Conklin, G.J. Hannon, and T.A. Rosenquist. 2003. Germline transmission of RNAi in mice. *Nat Struct Biol*. 10:91-2.
- Casanova, M.L., C. Blazquez, J. Martinez-Palacio, C. Villanueva, M.J. Fernandez-Acenero, J.W. Huffman, J.L. Jorcano, and M. Guzman. 2003. Inhibition of skin tumor growth and angiogenesis in vivo by activation of cannabinoid receptors. *J Clin Invest*. 111:43-50.
- Casanova, M.L., A. Bravo, J. Martinez-Palacio, M.J. Fernandez-Acenero, C. Villanueva, F. Larcher, C.J. Conti, and J.L. Jorcano. 2004. Epidermal abnormalities and increased malignancy of skin tumors in human epidermal keratin 8-expressing transgenic mice. *Faseb J*. 18:1556-8. Epub 2004 Aug 19.
- Casanova, M.L., F. Larcher, B. Casanova, R. Murillas, M.J. Fernandez-Acenero, C. Villanueva, J. Martinez-Palacio, A. Ullrich, C.J. Conti, and J.L. Jorcano. 2002. A critical role for ras-mediated, epidermal growth factor receptor-dependent angiogenesis in mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*. 62:3402-7.
- Courtois, G., and T.D. Gilmore. 2006. Mutations in the NF-kappaB signaling pathway: implications for human disease. *Oncogene*. 25:6831-43.

- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem.* 162:156-9.
- Dajee, M., M. Lazarov, J.Y. Zhang, T. Cai, C.L. Green, A.J. Russell, M.P. Marinkovich, S. Tao, Q. Lin, Y. Kubo, and P.A. Khavari. 2003. NF-kappaB blockade and oncogenic Ras trigger invasive human epidermal neoplasia. *Nature.* 421:639-43.
- Dale, B.A. 1985. Filaggrin, the matrix protein of keratin. *Am J Dermatopathol.* 7:65-8.
- Davis, M.A., and A.B. Reynolds. 2006. Blocked acinar development, E-cadherin reduction, and intraepithelial neoplasia upon ablation of p120-catenin in the mouse salivary gland. *Dev Cell.* 10:21-31.
- Del Rio, M., F. Larcher, F. Serrano, A. Meana, M. Munoz, M. Garcia, E. Munoz, C. Martin, A. Bernad, and J.L. Jorcano. 2002. A preclinical model for the analysis of genetically modified human skin in vivo. *Hum Gene Ther.* 13:959-68.
- Delhase, M., M. Hayakawa, Y. Chen, and M. Karin. 1999. Positive and negative regulation of IkappaB kinase activity through IKKbeta subunit phosphorylation. *Science.* 284:309-13.
- Dennis, G., Jr., B.T. Sherman, D.A. Hosack, J. Yang, W. Gao, H.C. Lane, and R.A. Lempicki. 2003. DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 4:P3.
- Devin, A., Y. Lin, S. Yamaoka, Z. Li, M. Karin, and Z. Liu. 2001. The alpha and beta subunits of IkappaB kinase (IKK) mediate TRAF2-dependent IKK recruitment to tumor necrosis factor (TNF) receptor 1 in response to TNF. *Mol Cell Biol.* 21:3986-94.
- DiDonato, J.A., M. Hayakawa, D.M. Rothwarf, E. Zandi, and M. Karin. 1997. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature.* 388:548-54.
- Dykxhoorn, D.M., C.D. Novina, and P.A. Sharp. 2003. Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 4:457-67.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411:494-8.
- Esemuede, N., T. Lee, D. Pierre-Paul, B.E. Sumpio, and V. Gahtan. 2004. The role of thrombospondin-1 in human disease. *J Surg Res.* 122:135-42.

- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 391:806-11.
- Frederickson, R.M., M.R. Micheau, A. Iwamoto, and N.G. Miyamoto. 1989. 5' flanking and first intron sequences of the human beta-actin gene required for efficient promoter activity. *Nucleic Acids Res.* 17:253-70.
- Fuchs, E. 1990. Epidermal differentiation: the bare essentials. *J Cell Biol.* 111:2807-14.
- Fuchs, E., and H. Green. 1980. Changes in keratin gene expression during terminal differentiation of the keratinocyte. *Cell*. 19:1033-42.
- Fuchs, E., B.J. Merrill, C. Jamora, and R. DasGupta. 2001. At the roots of a never-ending cycle. *Dev Cell*. 1:13-25.
- Fuchs, E., and S. Raghavan. 2002. Getting under the skin of epidermal morphogenesis. *Nat Rev Genet.* 3:199-209.
- Galve-Roperh, I., C. Sanchez, M.L. Cortes, T.G. del Pulgar, M. Izquierdo, and M. Guzman. 2000. Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med.* 6:313-9.
- Gareus, R., M. Huth, B. Breiden, A. Nenci, N. Rosch, I. Haase, W. Bloch, K. Sandhoff, and M. Pasparakis. 2007. Normal epidermal differentiation but impaired skin-barrier formation upon keratinocyte-restricted IKK1 ablation. *Nat Cell Biol.* 9:461-9. Epub 2007 Mar 11.
- Gaszner, M., and G. Felsenfeld. 2006. Insulators: exploiting transcriptional and epigenetic mechanisms. *Nat Rev Genet.* 7:703-13. Epub 2006 Aug 15.
- Gentleman, R.C., V.J. Carey, D.M. Bates, B. Bolstad, M. Dettling, S. Dudoit, B. Ellis, L. Gautier, Y. Ge, J. Gentry, K. Hornik, T. Hothorn, W. Huber, S. Iacus, R. Irizarry, F. Leisch, C. Li, M. Maechler, A.J. Rossini, G. Sawitzki, C. Smith, G. Smyth, L. Tierney, J.Y. Yang, and J. Zhang. 2004. Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol.* 5:R80.
- Gerretsen, A.L., F.A. Beemer, W. Deenstra, F.A. Hennekam, and W.A. van Vloten. 1995. Familial cutaneous cylindromas: investigations in five generations of a family. *J Am Acad Dermatol.* 33:199-206.
- Getsios, S., A.C. Huen, and K.J. Green. 2004. Working out the strength and flexibility of desmosomes. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5:271-81.

- Ghosh, S., and M. Karin. 2002. Missing pieces in the NF-kappaB puzzle. *Cell*. 109 Suppl:S81-96.
- Graham, F.L., J. Smiley, W.C. Russell, and R. Nairn. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*. 36:59-74.
- Greten, F.R., L. Eckmann, T.F. Greten, J.M. Park, Z.W. Li, L.J. Egan, M.F. Kagnoff, and M. Karin. 2004. IKKbeta links inflammation and tumorigenesis in a mouse model of colitis-associated cancer. *Cell*. 118:285-96.
- Hannon, G.J. 2002. RNA interference. *Nature*. 418:244-51.
- Hannon, G.J., and J.J. Rossi. 2004. Unlocking the potential of the human genome with RNA interference. *Nature*. 431:371-8.
- Hansen, L.A., and R.W. Tennant. 1994. Follicular origin of epidermal papillomas in v-Ha-ras transgenic TG.AC mouse skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:7822-6.
- Hardy, M.H. 1992. The secret life of the hair follicle. *Trends Genet*. 8:55-61.
- Hashimoto, K., N. Mori, T. Tamesa, T. Okada, S. Kawauchi, A. Oga, T. Furuya, A. Tangoku, M. Oka, and K. Sasaki. 2004. Analysis of DNA copy number aberrations in hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinomas by conventional CGH and array CGH. *Mod Pathol*. 17:617-22.
- Hasuwa, H., K. Kaseda, T. Einarsdottir, and M. Okabe. 2002. Small interfering RNA and gene silencing in transgenic mice and rats. *FEBS Lett*. 532:227-30.
- Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev*. 18:2195-224.
- Hemann, M.T., J.S. Fridman, J.T. Zilfou, E. Hernando, P.J. Paddison, C. Cordon-Cardo, G.J. Hannon, and S.W. Lowe. 2003. An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet*. 33:396-400.
- Heussen, C., and E.B. Dowdle. 1980. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecyl sulfate and copolymerized substrates. *Anal Biochem*. 102:196-202.
- Hoberg, J.E., F. Yeung, and M.W. Mayo. 2004. SMRT derepression by the IkappaB kinase alpha: a prerequisite to NF-kappaB transcription and survival. *Mol Cell*. 16:245-55.

- Hogan, B., R. Beddington, F. Costantini, and E. Lacy. 1994. *Manipulating the Mouse Embryo: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Hu, G., M. Onder, M. Gill, B. Aksakal, M. Oztas, M.A. Gurer, and J.T. Celebi. 2003. A novel missense mutation in CYLD in a family with Brooke-Spiegler syndrome. *J Invest Dermatol*. 121:732-4.
- Hu, M.C., D.F. Lee, W. Xia, L.S. Golfman, F. Ou-Yang, J.Y. Yang, Y. Zou, S. Bao, N. Hanada, H. Saso, R. Kobayashi, and M.C. Hung. 2004. IkappaB kinase promotes tumorigenesis through inhibition of forkhead FOXO3a. *Cell*. 117:225-37.
- Hu, Y., V. Baud, M. Delhase, P. Zhang, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, and M. Karin. 1999. Abnormal morphogenesis but intact IKK activation in mice lacking the IKKalpha subunit of IkappaB kinase. *Science*. 284:316-20.
- Hu, Y., V. Baud, T. Oga, K.I. Kim, K. Yoshida, and M. Karin. 2001. IKKalpha controls formation of the epidermis independently of NF-kappaB. *Nature*. 410:710-4.
- Huelsken, J., and J. Behrens. 2002. The Wnt signalling pathway. *J Cell Sci*. 115:3977-8.
- Huelsken, J., R. Vogel, B. Erdmann, G. Cotsarelis, and W. Birchmeier. 2001. beta-Catenin controls hair follicle morphogenesis and stem cell differentiation in the skin. *Cell*. 105:533-45.
- Huynh, Q.K., H. Boddupalli, S.A. Rouw, C.M. Koboldt, T. Hall, C. Sommers, S.D. Hauser, J.L. Pierce, R.G. Combs, B.A. Reitz, J.A. Diaz-Collier, R.A. Weinberg, B.L. Hood, B.F. Kilpatrick, and C.S. Tripp. 2000. Characterization of the recombinant IKK1/IKK2 heterodimer. Mechanisms regulating kinase activity. *J Biol Chem*. 275:25883-91.
- Ikeda, F., and I. Dikic. 2006. CYLD in ubiquitin signaling and tumor pathogenesis. *Cell*. 125:643-5.
- Jamora, C., and E. Fuchs. 2002. Intercellular adhesion, signalling and the cytoskeleton. *Nat Cell Biol*. 4:E101-8.
- Jarnik, M., P.A. de Viragh, E. Scharer, D. Bundman, M.N. Simon, D.R. Roop, and A.C. Steven. 2002. Quasi-normal cornified cell envelopes in loricrin knockout mice imply the existence of a loricrin backup system. *J Invest Dermatol*. 118:102-9.
- Jensen, P.J., B. Telegan, R.M. Lavker, and M.J. Wheelock. 1997. E-cadherin and P-cadherin have partially redundant roles in human epidermal stratification. *Cell Tissue Res*. 288:307-16.

- Johnson, C., D. Van Antwerp, and T.J. Hope. 1999. An N-terminal nuclear export signal is required for the nucleocytoplasmic shuttling of IkappaBalpha. *Embo J.* 18:6682-93.
- Johnson, W.C., and E.B. Helwig. 1966. Adenoid squamous cell carcinoma (adenoacanthoma). A clinicopathologic study of 155 patients. *Cancer.* 19:1639-50.
- Jorda, M., D. Olmeda, A. Vinyals, E. Valero, E. Cubillo, A. Llorens, A. Cano, and A. Fabra. 2005. Upregulation of MMP-9 in MDCK epithelial cell line in response to expression of the Snail transcription factor. *J Cell Sci.* 118:3371-85.
- Karin, M. 1999. How NF-kappaB is activated: the role of the IkappaB kinase (IKK) complex. *Oncogene.* 18:6867-74.
- Karin, M. 2006a. NF-kappaB and cancer: mechanisms and targets. *Mol Carcinog.* 45:355-61.
- Karin, M. 2006b. Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. *Nature.* 441:431-6.
- Karin, M., Y. Cao, F.R. Greten, and Z.W. Li. 2002. NF-kappaB in cancer: from innocent bystander to major culprit. *Nat Rev Cancer.* 2:301-10.
- Karin, M., and F.R. Greten. 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol.* 5:749-59.
- Kawabe, T.T., T.J. Rea, A.M. Flenniken, B.R. Williams, V.E. Groppi, and A.E. Buhl. 1991. Localization of TIMP in cycling mouse hair. *Development.* 111:877-9.
- Klein-Szanto, A.J. 1989. Pathology of human and experimental skin tumors. *Carcinog Compr Surv.* 11:19-53.
- Kobielak, A., and E. Fuchs. 2006. Links between alpha-catenin, NF-kappaB, and squamous cell carcinoma in skin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:2322-7. Epub 2006 Feb 1.
- Koster, M.I., D. Dai, B. Marinari, Y. Sano, A. Costanzo, M. Karin, and D.R. Roop. 2007. p63 induces key target genes required for epidermal morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 104:3255-60.
- Koster, M.I., S.L. Lu, L.D. White, X.J. Wang, and D.R. Roop. 2006. Reactivation of developmentally expressed p63 isoforms predisposes to tumor development and progression. *Cancer Res.* 66:3981-6.

- Kovalenko, A., C. Chable-Bessia, G. Cantarella, A. Israel, D. Wallach, and G. Courtois. 2003. The tumour suppressor CYLD negatively regulates NF-kappaB signalling by deubiquitination. *Nature*. 424:801-5.
- Kubo, Y., Y. Urano, Y. Hida, and S. Arase. 1999. Lack of somatic mutation in the PTEN gene in squamous cell carcinomas of human skin. *J Dermatol Sci*. 19:199-201.
- Kucharczak, J., M.J. Simmons, Y. Fan, and C. Gelinas. 2003. To be, or not to be: NF-kappaB is the answer--role of Rel/NF-kappaB in the regulation of apoptosis. *Oncogene*. 22:8961-82.
- Kulesz-Martin, M., A.E. Kilkenney, K.A. Holbrook, V. Digernes, and S.H. Yuspa. 1983. Properties of carcinogen altered mouse epidermal cells resistant to calcium-induced terminal differentiation. *Carcinogenesis*. 4:1367-77.
- Kunath, T., G. Gish, H. Lickert, N. Jones, T. Pawson, and J. Rossant. 2003. Transgenic RNA interference in ES cell-derived embryos recapitulates a genetic null phenotype. *Nat Biotechnol*. 21:559-61.
- Kwak, Y.T., R. Li, C.R. Becerra, D. Tripathy, E.P. Frenkel, and U.N. Verma. 2005. IkappaB kinase alpha regulates subcellular distribution and turnover of cyclin D1 by phosphorylation. *J Biol Chem*. 280:33945-52.
- Lamberti, C., K.M. Lin, Y. Yamamoto, U. Verma, I.M. Verma, S. Byers, and R.B. Gaynor. 2001. Regulation of beta-catenin function by the IkappaB kinases. *J Biol Chem*. 276:42276-86. Epub 2001 Aug 29.
- Larcher, F., C. Bauluz, M. Diaz-Guerra, M. Quintanilla, C.J. Conti, C. Ballestin, and J.L. Jorcano. 1992. Aberrant expression of the simple epithelial type II keratin 8 by mouse skin carcinomas but not papillomas. *Mol Carcinog*. 6:112-21.
- Larcher, F., R. Murillas, M. Bolontrade, C.J. Conti, and J.L. Jorcano. 1998. VEGF/VPF overexpression in skin of transgenic mice induces angiogenesis, vascular hyperpermeability and accelerated tumor development. *Oncogene*. 17:303-11.
- Larue, L., M. Ohsugi, J. Hirchenhain, and R. Kemler. 1994. E-cadherin null mutant embryos fail to form a trophectoderm epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91:8263-7.
- Lawrence, T., M. Bebie, G.Y. Liu, V. Nizet, and M. Karin. 2005. IKKalpha limits macrophage NF-kappaB activation and contributes to the resolution of inflammation. *Nature*. 434:1138-43.
- Leboit, P.E., Burg G., Weedon D., Sarasin A. 2006. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Skin Tumours. IARC Press, Lyon.

- Leder, A., A. Kuo, R.D. Cardiff, E. Sinn, and P. Leder. 1990. v-Ha-ras transgene abrogates the initiation step in mouse skin tumorigenesis: effects of phorbol esters and retinoic acid. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87:9178-82.
- Leis, H., A. Page, A. Ramirez, A. Bravo, C. Segrelles, J. Paramio, D. Baretino, J.L. Jorcano, and P. Perez. 2004. Glucocorticoid Receptor Counteracts Tumorigenic Activity of Akt in Skin through Interference with the Phosphatidylinositol 3-Kinase Signaling Pathway. *Mol Endocrinol*. 18:303-11. Epub 2003 Nov 13.
- Li, K., and R.S. Williams. 1995. Cloning and characterization of three new murine genes encoding short homologues of RNase P RNA. *J Biol Chem*. 270:25281-5.
- Li, Q., Q. Lu, J.Y. Hwang, D. Buscher, K.F. Lee, J.C. Izpisua-Belmonte, and I.M. Verma. 1999a. IKK1-deficient mice exhibit abnormal development of skin and skeleton. *Genes Dev*. 13:1322-8.
- Li, Q., D. Van Antwerp, F. Mercurio, K.F. Lee, and I.M. Verma. 1999b. Severe liver degeneration in mice lacking the IkappaB kinase 2 gene. *Science*. 284:321-5.
- Li, Q., and I.M. Verma. 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*. 2:725-34.
- Li, Z.W., W. Chu, Y. Hu, M. Delhase, T. Deerinck, M. Ellisman, R. Johnson, and M. Karin. 1999c. The IKKbeta subunit of IkappaB kinase (IKK) is essential for nuclear factor kappaB activation and prevention of apoptosis. *J Exp Med*. 189:1839-45.
- Limmer, B.L. 2001. Nonmelanoma skin cancer: today's epidemic. *Tex Med*. 97:56-8.
- Liu, B., E. Park, F. Zhu, T. Bustos, J. Liu, J. Shen, S.M. Fischer, and Y. Hu. 2006. A critical role for I kappaB kinase alpha in the development of human and mouse squamous cell carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:17202-7. Epub 2006 Nov 1.
- Liu, Y.N., W.W. Lee, C.Y. Wang, T.H. Chao, Y. Chen, and J.H. Chen. 2005. Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression. *Oncogene*. 24:8277-90.
- Lois, C., E.J. Hong, S. Pease, E.J. Brown, and D. Baltimore. 2002. Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science*. 295:868-72.
- Luo, J.L., W. Tan, J.M. Ricono, O. Korchynskyi, M. Zhang, S.L. Gonias, D.A. Cheresch, and M. Karin. 2007. Nuclear cytokine-activated IKKalpha controls prostate cancer metastasis by repressing Maspin. *Nature*. 446:690-4. Epub 2007 Mar 18.

- Madison, K.C. 2003. Barrier function of the skin: "la raison d'etre" of the epidermis. *J Invest Dermatol.* 121:231-41.
- Maeda, G., T. Chiba, S. Kawashiri, T. Satoh, and K. Imai. 2007. Epigenetic inactivation of IkappaB Kinase-alpha in oral carcinomas and tumor progression. *Clin Cancer Res.* 13:5041-7.
- Makris, C., V.L. Godfrey, G. Krahn-Senftleben, T. Takahashi, J.L. Roberts, T. Schwarz, L. Feng, R.S. Johnson, and M. Karin. 2000. Female mice heterozygous for IKK gamma/NEMO deficiencies develop a dermatopathy similar to the human X-linked disorder incontinentia pigmenti. *Mol Cell.* 5:969-79.
- Mann, H., Y. Ben-Asouli, A. Schein, S. Moussa, and N. Jarrous. 2003. Eukaryotic RNase P: role of RNA and protein subunits of a primordial catalytic ribonucleoprotein in RNA-based catalysis. *Mol Cell.* 12:925-35.
- Massoumi, R., K. Chmielarska, K. Hennecke, A. Pfeifer, and R. Fassler. 2006. Cxcl12 inhibits tumor cell proliferation by blocking Bcl-3-dependent NF-kappaB signaling. *Cell.* 125:665-77.
- McGrath, J.A., R.A.J. Eady, and F.M. Pope. 2004. Anatomy and Organization of Human Skin. In Rook's Textbook of Dermatology. S.M. Breathnach, D.A. Burns, N.H. Cox, C.E.M. Griffiths, editor. Blackwell Science Ltd, Oxford.
- McKoy, G., N. Protonotarios, A. Crosby, A. Tsatsopoulou, A. Anastasakis, A. Coonar, M. Norman, C. Baboonian, S. Jeffery, and W.J. McKenna. 2000. Identification of a deletion in plakoglobin in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy with palmoplantar keratoderma and woolly hair (Naxos disease). *Lancet.* 355:2119-24.
- Mehrel, T., D. Hohl, J.A. Rothnagel, M.A. Longley, D. Bundman, C. Cheng, U. Lichti, M.E. Bisher, A.C. Steven, P.M. Steinert, and et al. 1990. Identification of a major keratinocyte cell envelope protein, loricrin. *Cell.* 61:1103-12.
- Meister, G., and T. Tuschl. 2004. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 431:343-9.
- Mercurio, F., H. Zhu, B.W. Murray, A. Shevchenko, B.L. Bennett, J. Li, D.B. Young, M. Barbosa, M. Mann, A. Manning, and A. Rao. 1997. IKK-1 and IKK-2: cytokine-activated IkappaB kinases essential for NF-kappaB activation. *Science.* 278:860-6.
- Michibata, H., H. Chiba, K. Wakimoto, M. Seishima, S. Kawasaki, K. Okubo, H. Mitsui, H. Torii, and Y. Imai. 2004. Identification and characterization of a novel component of the cornified envelope, cornifelin. *Biochem Biophys Res Commun.* 318:803-13.

- Miller, B.S., and E. Zandi. 2001. Complete reconstitution of human IkappaB kinase (IKK) complex in yeast. Assessment of its stoichiometry and the role of IKKgamma on the complex activity in the absence of stimulation. *J Biol Chem.* 276:36320-6. Epub 2001 Jul 24.
- Miller, S.J. 2000. The National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines of care for nonmelanoma skin cancers. *Dermatol Surg.* 26:289-92.
- Moll, R., W.W. Franke, D.L. Schiller, B. Geiger, and R. Krepler. 1982. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* 31:11-24.
- Nakayama, H., T. Ikebe, and K. Shirasuna. 2005. Effects of IkappaB kinase alpha on the differentiation of squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 41:729-37.
- Nappi, O., G. Pettinato, and M.R. Wick. 1989. Adenoid (acantholytic) squamous cell carcinoma of the skin. *J Cutan Pathol.* 16:114-21.
- Navarro, P., M. Gomez, A. Pizarro, C. Gamallo, M. Quintanilla, and A. Cano. 1991. A role for the E-cadherin cell-cell adhesion molecule during tumor progression of mouse epidermal carcinogenesis. *J Cell Biol.* 115:517-33.
- Nelson, D., and R. Ganss. 2006. Tumor growth or regression: powered by inflammation. *J Leukoc Biol.* 80:685-90.
- Nykanen, A., B. Haley, and P.D. Zamore. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell.* 107:309-21.
- Oberdoerffer, P., C. Kanellopoulou, V. Heissmeyer, C. Paepers, C. Borowski, I. Aifantis, A. Rao, and K. Rajewsky. 2005. Efficiency of RNA interference in the mouse hematopoietic system varies between cell types and developmental stages. *Mol Cell Biol.* 25:3896-905.
- Palmiter, R.D., and R.L. Brinster. 1986. Germ-line transformation of mice. *Annu Rev Genet.* 20:465-99.
- Paramio, J.M., C. Segrelles, M.L. Casanova, and J.L. Jorcano. 2000. Opposite functions for E2F1 and E2F4 in human epidermal keratinocyte differentiation. *J Biol Chem.* 275:41219-26.
- Park, E., F. Zhu, B. Liu, X. Xia, J. Shen, T. Bustos, S.M. Fischer, and Y. Hu. 2007. Reduction in IkappaB kinase alpha expression promotes the development of skin papillomas and carcinomas. *Cancer Res.* 67:9158-68.
- Park, G.T., S.E. Lim, S.I. Jang, and M.I. Morasso. 2002. Suprabasin, a novel epidermal differentiation marker and potential cornified envelope precursor. *J Biol Chem.* 277:45195-202.

- Payne, A.S., Y. Hanakawa, M. Amagai, and J.R. Stanley. 2004. Desmosomes and disease: pemphigus and bullous impetigo. *Curr Opin Cell Biol.* 16:536-43.
- Peinado, H., D. Olmeda, and A. Cano. 2007. Snail, Zeb and bHLH factors in tumour progression: an alliance against the epithelial phenotype? *Nat Rev Cancer.* 7:415-28.
- Perez-Moreno, M., C. Jamora, and E. Fuchs. 2003. Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. *Cell.* 112:535-48.
- Perez, P., A. Page, and J.L. Jorcano. 2000. Role of phosphorylated p50-NF-kappaB in the ultraviolet response of mouse skin. *Mol Carcinog.* 27:272-9.
- Perkins, N.D. 2004. NF-kappaB: tumor promoter or suppressor? *Trends Cell Biol.* 14:64-9.
- Perkins, N.D. 2007. Integrating cell-signalling pathways with NF-kappaB and IKK function. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 8:49-62.
- Petersen, S., J. Rudolf, U. Bockmuhl, K. Gellert, G. Wolf, M. Dietel, and I. Petersen. 1998. Distinct regions of allelic imbalance on chromosome 10q22-q26 in squamous cell carcinomas of the lung. *Oncogene.* 17:449-54.
- Petter, G., and U.F. Haustein. 2000. Histologic subtyping and malignancy assessment of cutaneous squamous cell carcinoma. *Dermatol Surg.* 26:521-30.
- Pierceall, W.E., L.H. Goldberg, M.A. Tainsky, T. Mukhopadhyay, and H.N. Ananthaswamy. 1991. Ras gene mutation and amplification in human nonmelanoma skin cancers. *Mol Carcinog.* 4:196-202.
- Poblete Gutierrez, P., T. Eggermann, D. Holler, F.K. Jugert, T. Beermann, E.I. Grussendorf-Conen, K. Zerres, H.F. Merk, and J. Frank. 2002. Phenotype diversity in familial cylindromatosis: a frameshift mutation in the tumor suppressor gene CYLD underlies different tumors of skin appendages. *J Invest Dermatol.* 119:527-31.
- Poyet, J.L., S.M. Srinivasula, J.H. Lin, T. Fernandes-Alnemri, S. Yamaoka, P.N. Tsichlis, and E.S. Alnemri. 2000. Activation of the Ikappa B kinases by RIP via IKKgamma /NEMO-mediated oligomerization. *J Biol Chem.* 275:37966-77.
- Quintanilla, M., K. Brown, M. Ramsden, and A. Balmain. 1986. Carcinogen-specific mutation and amplification of Ha-ras during mouse skin carcinogenesis. *Nature.* 322:78-80.
- Quintanilla, M., S. Haddow, D. Jonas, D. Jaffe, G.T. Bowden, and A. Balmain. 1991. Comparison of ras activation during epidermal carcinogenesis in vitro and in vivo. *Carcinogenesis.* 12:1875-81.

- Ramirez, A., A. Bravo, J.L. Jorcano, and M. Vidal. 1994. Sequences 5' of the bovine keratin 5 gene direct tissue- and cell-type-specific expression of a lacZ gene in the adult and during development. *Differentiation*. 58:53-64.
- Regnier, C.H., H.Y. Song, X. Gao, D.V. Goeddel, Z. Cao, and M. Rothe. 1997. Identification and characterization of an IkappaB kinase. *Cell*. 90:373-83.
- Reiley, W.W., M. Zhang, W. Jin, M. Losiewicz, K.B. Donohue, C.C. Norbury, and S.C. Sun. 2006. Regulation of T cell development by the deubiquitinating enzyme CYLD. *Nat Immunol*. 7:411-7. Epub 2006 Feb 26.
- Rice, R.H., and H. Green. 1979. Presence in human epidermal cells of a soluble protein precursor of the cross-linked envelope: activation of the cross-linking by calcium ions. *Cell*. 18:681-94.
- Rogers, G.E. 2004. Hair follicle differentiation and regulation. *Int J Dev Biol*. 48:163-70.
- Roop, D.R., T.M. Krieg, T. Mehrel, C.K. Cheng, and S.H. Yuspa. 1988. Transcriptional control of high molecular weight keratin gene expression in multistage mouse skin carcinogenesis. *Cancer Res*. 48:3245-52.
- Rothe, M., S.C. Wong, W.J. Henzel, and D.V. Goeddel. 1994. A novel family of putative signal transducers associated with the cytoplasmic domain of the 75 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 78:681-92.
- Rothwarf, D.M., and M. Karin. 1999. The NF-kappa B activation pathway: a paradigm in information transfer from membrane to nucleus. *Sci STKE*. 1999:RE1.
- Rothwarf, D.M., E. Zandi, G. Natoli, and M. Karin. 1998. IKK-gamma is an essential regulatory subunit of the IkappaB kinase complex. *Nature*. 395:297-300.
- Rubinson, D.A., C.P. Dillon, A.V. Kwiatkowski, C. Sievers, L. Yang, J. Kopinja, D.L. Rooney, M.M. Ihrig, M.T. McManus, F.B. Gertler, M.L. Scott, and L. Van Parijs. 2003. A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet*. 33:401-6.
- Rudolph, D., W.C. Yeh, A. Wakeham, B. Rudolph, D. Nallainathan, J. Potter, A.J. Elia, and T.W. Mak. 2000. Severe liver degeneration and lack of NF-kappaB activation in NEMO/IKKgamma-deficient mice. *Genes Dev*. 14:854-62.
- Ruegg, C. 2006. Leukocytes, inflammation, and angiogenesis in cancer: fatal attractions. *J Leukoc Biol*. 80:682-4.

- Ruggeri, B., J. Caamano, T. Goodrow, M. DiRado, A. Bianchi, D. Trono, C.J. Conti, and A.J. Klein-Szanto. 1991. Alterations of the p53 tumor suppressor gene during mouse skin tumor progression. *Cancer Res.* 51:6615-21.
- Ruland, J., and T.W. Mak. 2003. Transducing signals from antigen receptors to nuclear factor kappaB. *Immunol Rev.* 193:93-100.
- Ryle, C.M., D. Breitkreutz, H.J. Stark, I.M. Leigh, P.M. Steinert, D. Roop, and N.E. Fusenig. 1989. Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation.* 40:42-54.
- Scheidereit, C. 2006. IkappaB kinase complexes: gateways to NF-kappaB activation and transcription. *Oncogene.* 25:6685-705.
- Seibler, J., B. Kuter-Luks, H. Kern, S. Streu, L. Plum, J. Mauer, R. Kuhn, J.C. Bruning, and F. Schwenk. 2005. Single copy shRNA configuration for ubiquitous gene knockdown in mice. *Nucleic Acids Res.* 33:e67.
- Seitz, C.S., Q. Lin, H. Deng, and P.A. Khavari. 1998. Alterations in NF-kappaB function in transgenic epithelial tissue demonstrate a growth inhibitory role for NF-kappaB. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:2307-12.
- Senftleben, U., Y. Cao, G. Xiao, F.R. Greten, G. Krahn, G. Bonizzi, Y. Chen, Y. Hu, A. Fong, S.C. Sun, and M. Karin. 2001. Activation by IKKalpha of a second, evolutionary conserved, NF-kappa B signaling pathway. *Science.* 293:1495-9.
- Sherr, C.J. 1996. Cancer cell cycles. *Science.* 274:1672-7.
- Shim, J.S., D.H. Kim, and H.J. Kwon. 2004. Plakoglobin is a new target gene of histone deacetylase in human fibrosarcoma HT1080 cells. *Oncogene.* 23:1704-11.
- Shinagawa, T., and S. Ishii. 2003. Generation of Ski-knockdown mice by expressing a long double-strand RNA from an RNA polymerase II promoter. *Genes Dev.* 17:1340-5.
- Sil, A.K., S. Maeda, Y. Sano, D.R. Roop, and M. Karin. 2004. IkappaB kinase-alpha acts in the epidermis to control skeletal and craniofacial morphogenesis. *Nature.* 428:660-4.
- Silverman, N., and T. Maniatis. 2001. NF-kappaB signaling pathways in mammalian and insect innate immunity. *Genes Dev.* 15:2321-42.
- Slaga, T.J., I.V. Budunova, I.B. Gimenez-Conti, and C.M. Aldaz. 1996. The mouse skin carcinogenesis model. *J Invest Dermatol Symp Proc.* 1:151-6.

- Smyth, G.K. 2004. Linear models and empirical bayes methods for assessing differential expression in microarray experiments. *Stat Appl Genet Mol Biol.* 3:Article3.
- Solovey, A., L. Gui, S. Ramakrishnan, M.H. Steinberg, and R.P. Hebbel. 1999. Sick cell anemia as a possible state of enhanced anti-apoptotic tone: survival effect of vascular endothelial growth factor on circulating and unanchored endothelial cells. *Blood.* 93:3824-30.
- Spalding, J.W., J. Momma, M.R. Elwell, and R.W. Tennant. 1993. Chemically induced skin carcinogenesis in a transgenic mouse line (TG.AC) carrying a v-Ha-ras gene. *Carcinogenesis.* 14:1335-41.
- St-Jacques, B., H.R. Dasse, I. Karavanova, V.A. Botchkarev, J. Li, P.S. Danielian, J.A. McMahon, P.M. Lewis, R. Paus, and A.P. McMahon. 1998. Sonic hedgehog signaling is essential for hair development. *Curr Biol.* 8:1058-68.
- Strobel, P., A. Zettl, Z. Ren, P. Starostik, H. Riedmiller, S. Storkel, H.K. Muller-Hermelink, and A. Marx. 2002. Spiradenocylindroma of the kidney: clinical and genetic findings suggesting a role of somatic mutation of the CYLD1 gene in the oncogenesis of an unusual renal neoplasm. *Am J Surg Pathol.* 26:119-24.
- Takeda, K., O. Takeuchi, T. Tsujimura, S. Itami, O. Adachi, T. Kawai, H. Sanjo, K. Yoshikawa, N. Terada, and S. Akira. 1999. Limb and skin abnormalities in mice lacking IKK α . *Science.* 284:313-6.
- Tanaka, M., M.E. Fuentes, K. Yamaguchi, M.H. Durnin, S.A. Dalrymple, K.L. Hardy, and D.V. Goeddel. 1999. Embryonic lethality, liver degeneration, and impaired NF-kappa B activation in IKK-beta-deficient mice. *Immunity.* 10:421-9.
- Tang, E.D., N. Inohara, C.Y. Wang, G. Nunez, and K.L. Guan. 2003. Roles for homotypic interactions and transautophosphorylation in IkappaB kinase beta (IKKbeta) activation [corrected]. *J Biol Chem.* 278:38566-70.
- Tinkle, C.L., T. Lechler, H.A. Pasolli, and E. Fuchs. 2004. Conditional targeting of E-cadherin in skin: insights into hyperproliferative and degenerative responses. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:552-7.
- Tiscornia, G., O. Singer, M. Ikawa, and I.M. Verma. 2003. A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:1844-8.
- Trompouki, E., E. Hatzivassiliou, T. Tsihritzis, H. Farmer, A. Ashworth, and G. Mosialos. 2003. CYLD is a deubiquitinating enzyme that negatively regulates NF-kappaB activation by TNFR family members. *Nature.* 424:793-6.

- Tsukita, S., and M. Furuse. 2002. Claudin-based barrier in simple and stratified cellular sheets. *Curr Opin Cell Biol.* 14:531-6.
- Tunggal, J.A., I. Helfrich, A. Schmitz, H. Schwarz, D. Gunzel, M. Fromm, R. Kemler, T. Krieg, and C.M. Niessen. 2005. E-cadherin is essential for in vivo epidermal barrier function by regulating tight junctions. *Embo J.* 24:1146-56. Epub 2005 Mar 3.
- Turner, F.E., S. Broad, F.L. Khamis, A. Jeanes, S. Talma, S. Hughes, C. Tselepis, and N.A. Hotchin. 2006. Slug regulates integrin expression and cell proliferation in human epidermal keratinocytes. *J Biol Chem.* 281:21321-31. Epub 2006 May 17.
- Tuschl, T. 2002. Expanding small RNA interference. *Nat Biotechnol.* 20:446-8.
- van Hogerlinden, M., B.L. Rozell, L. Ahrlund-Richter, and R. Toftgard. 1999. Squamous cell carcinomas and increased apoptosis in skin with inhibited Rel/nuclear factor-kappaB signaling. *Cancer Res.* 59:3299-303.
- Ventura, A., A. Meissner, C.P. Dillon, M. McManus, P.A. Sharp, L. Van Parijs, R. Jaenisch, and T. Jacks. 2004. Cre-lox-regulated conditional RNA interference from transgenes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101:10380-5.
- Vleminckx, K., L. Vakaet, Jr., M. Mareel, W. Fiers, and F. van Roy. 1991. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an invasion suppressor role. *Cell.* 66:107-19.
- Waterhouse, P.M., M.B. Wang, and T. Lough. 2001. Gene silencing as an adaptive defence against viruses. *Nature.* 411:834-42.
- Wicki, A., F. Lehembre, N. Wick, B. Hantusch, D. Kerjaschki, and G. Christofori. 2006. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell.* 9:261-72.
- Williams, B.R. 1997. Role of the double-stranded RNA-activated protein kinase (PKR) in cell regulation. *Biochem Soc Trans.* 25:509-13.
- Winter, H., M. Rentrop, R. Nischt, and J. Schweizer. 1990. Tissue-specific expression of murine keratin K13 in internal stratified squamous epithelia and its aberrant expression during two-stage mouse skin carcinogenesis is associated with the methylation state of a distinct CpG site in the remote 5'-flanking region of the gene. *Differentiation.* 43:105-14.
- Woodroffe, C., W. Muller, and U. Ruther. 1992. Long-term consequences of interleukin-6 overexpression in transgenic mice. *DNA Cell Biol.* 11:587-92.

- Wu, C., and S. Ghosh. 2003. Differential phosphorylation of the signal-responsive domain of I kappa B alpha and I kappa B beta by I kappa B kinases. *J Biol Chem.* 278:31980-7. Epub 2003 Jun 5.
- Yamamoto, Y., and R.B. Gaynor. 2004. IkappaB kinases: key regulators of the NF-kappaB pathway. *Trends Biochem Sci.* 29:72-9.
- Yamamoto, Y., U.N. Verma, S. Prajapati, Y.T. Kwak, and R.B. Gaynor. 2003. Histone H3 phosphorylation by IKK-alpha is critical for cytokine-induced gene expression. *Nature.* 423:655-9.
- Yamaoka, S., G. Courtois, C. Bessia, S.T. Whiteside, R. Weil, F. Agou, H.E. Kirk, R.J. Kay, and A. Israel. 1998. Complementation cloning of NEMO, a component of the IkappaB kinase complex essential for NF-kappaB activation. *Cell.* 93:1231-40.
- Yang, J., S.A. Mani, J.L. Donaher, S. Ramaswamy, R.A. Itzykson, C. Come, P. Savagner, I. Gitelman, A. Richardson, and R.A. Weinberg. 2004. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell.* 117:927-39.
- Yap, A.S., W.M. Brieher, and B.M. Gumbiner. 1997. Molecular and functional analysis of cadherin-based adherens junctions. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 13:119-46.
- Young, P., O. Boussadia, H. Halfter, R. Grose, P. Berger, D.P. Leone, H. Robenek, P. Charnay, R. Kemler, and U. Suter. 2003. E-cadherin controls adherens junctions in the epidermis and the renewal of hair follicles. *Embo J.* 22:5723-33.
- Yuspa, S.H., D. Morgan, U. Lichti, E.F. Spangler, D. Michael, A. Kilkenny, and H. Hennings. 1986. Cultivation and characterization of cells derived from mouse skin papillomas induced by an initiation-promotion protocol. *Carcinogenesis.* 7:949-58.
- Zhang, H.T., P. Craft, P.A. Scott, M. Ziche, H.A. Weich, A.L. Harris, and R. Bicknell. 1995. Enhancement of tumor growth and vascular density by transfection of vascular endothelial cell growth factor into MCF-7 human breast carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst.* 87:213-9.
- Zhang, J., B. Stirling, S.T. Temmerman, C.A. Ma, I.J. Fuss, J.M. Derry, and A. Jain. 2006. Impaired regulation of NF-kappaB and increased susceptibility to colitis-associated tumorigenesis in CYLD-deficient mice. *J Clin Invest.* 116:3042-9. Epub 2006 Oct 19.
- Zhou, H., X.G. Xia, and Z. Xu. 2005. An RNA polymerase II construct synthesizes short-hairpin RNA with a quantitative indicator and mediates highly efficient RNAi. *Nucleic Acids Res.* 33:e62.

- Zhu, A.J., and F.M. Watt. 1996. Expression of a dominant negative cadherin mutant inhibits proliferation and stimulates terminal differentiation of human epidermal keratinocytes. *J Cell Sci.* 109:3013-23.
- Ziegler, A., D.J. Leffell, S. Kunala, H.W. Sharma, M. Gailani, J.A. Simon, A.J. Halperin, H.P. Baden, P.E. Shapiro, A.E. Bale, and et al. 1993. Mutation hotspots due to sunlight in the p53 gene of nonmelanoma skin cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:4216-20.

8 ANEXO I

Tabla 6. Lista de genes inducidos y reprimidos seleccionados y de mayor interés.

ADHESIÓN			
Inducción	Símbolo	Nombre	Valor de p
2,03	SLURP1	secreted LY6/PLAUR domain containing 1	0,0068
1,82	DSC2	desmocollin 2	0,0158
1,79	DSG1	desmoglein 1	0,0161
1,78	COL6A2	collagen, type VI, alpha 2	0,075
1,78	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	0,0255
1,73	DSG4	desmoglein 4	0,056
1,65	COL6A3	collagen, type VI, alpha 3	0,0423
1,58	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	0,0721
1,56	PCDH18	protocadherin 18	0,0863
-1,67	MUC4	mucin 4, cell surface associated	0,0524
-1,78	DST	dystonin	0,0225
-1,91	TNC	tenascin C (hexabrachion)	0,01
-1,97	CD36	CD36 molecule (thrombospondin receptor)	0,0076
-2,00	ITGB6	integrin, beta 6	0,0443
-2,07	PLEKHH2	pleckstrin homology domain containing, family H member 2	0,0119
-4,08	CLDN8	claudin 8	0,0017
DIFERENCIACIÓN Y DESARROLLO EPIDÉRMICO			
Inducción	Símbolo	Nombre	Valor de p
4,47	EREG	epiregulin	0,0047
4,03	CNFN	cornifelin	0,0015
3,84	LCE3D	late cornified envelope 3D	0,0015
3,10	SCEL	sciellin	0,0015
3,05	SPRR2C	small proline-rich protein 2C	0,0032
3,01	SPRR3	small proline-rich protein 3	0,0034
2,11	S100P	S100 calcium binding protein P	0,0654
2,30	SBSN	suprabasin	0,0068
2,97	CDSN	corneodesmosin	0,0143
2,58	BMP6	bone morphogenetic protein 6	0,0065
2,46	DHRS9	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 9	0,0028
2,39	TWIST1	twist homolog 1	0,1754
2,39	SPRR2G	small proline-rich protein 2G	0,0082
2,30	SPRR2B	small proline-rich protein 2B	0,0048
2,19	KRT23	keratin 23 (histone deacetylase inducible)	0,0036
1,91	TGM1	transglutaminase 1 (K polypeptide epidermal type I)	0,0162
1,80	STEAP4	STEAP family member 4	0,0586
1,74	TWIST2	twist homolog 2 (Drosophila)	0,0995
1,69	S100A7	S100 calcium binding protein A7 (psoriasin 1)	0,0547
1,52	KRT16	keratin 16 (focal non-epidermolytic palmoplantar keratoderma)	0,0676
-1,56	TNFAIP2	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 2	0,0829
-1,85	KRT15	keratin 15	0,0367
-1,92	SEMA6D	sema domain, transmembrane domain (TM), and cytoplasmic domain	0,0452
-1,93	NDRG4	NDRG family member 4	0,0935
-2,19	EVI1	ecotropic viral integration site 1	0,0125
-2,20	KRT19	keratin 19	0,0032
PROTEOLISIS			
Inducción	Símbolo	Nombre	Valor de p
2,41	ADAMTS5	ADAM metallopeptidase with thrombospondin type 1 motif, 5	0,0213
2,17	DPP4	dipeptidyl-peptidase 4	0,0307
1,93	KLK7	kallikrein 7 (chymotryptic, stratum corneum)	0,0125
1,91	KLK5	kallikrein 5	0,0329
1,88	MASP1	mannan-binding lectin serine peptidase 1	0,0711
1,80	TMPRSS11D	transmembrane protease, serine 11D	0,0211
1,65	PAPPA	pregnancy-associated plasma protein A, pappalysin 1	0,069
1,59	PRSS3	protease, serine, 3 (mesotrypsin)	0,0771
1,54	CTSK	cathepsin K (pseudosostosis)	0,0745
-1,87	PCSK5	proprotein convertase subtilisin/kexin type 5	0,0612
-1,92	CAT	catalase	0,0188
-2,14	CTSH	cathepsin H	0,0496
-2,22	MMP13	matrix metallopeptidase 13 (collagenase 3)	0,0151
-2,28	PLAT	plasminogen activator, tissue	0,0025
-2,31	UBD	ubiquitin D	0,0073
-2,97	MMP12	matrix metallopeptidase 12 (macrophage elastase)	0,0255

RESPUESTA INMUNE E INFLAMACIÓN			
Inducción	Símbolo	Nombre	Valor de p
2,97	PTX3	pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta	0,071
2,16	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78	0,0061
2,08	DEFB4	defensin, beta 4	0,0501
2,08	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	0,0095
2,06	IL1A	interleukin 1, alpha	0,0547
2,03	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	0,0866
2,00	IL1RL1	interleukin 1 receptor-like 1	0,0201
1,99	IFI44	interferon-induced protein 44	0,0136
1,92	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	0,0753
1,79	CD24	CD24 molecule	0,049
1,78	TNFAIP6	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 6	0,0255
1,77	DEFB1	defensin, beta 1	0,0225
1,75	CD24	CD24 molecule	0,0575
1,66	IL1B	interleukin 1, beta	0,0329
1,66	IL1F9	interleukin 1 family, member 9	0,0331
1,65	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	0,0366
1,61	AOX1	aldehyde oxidase 1	0,0995
1,58	CXCL12	chemokine (C-X-C motif) ligand 12 (stromal cell-derived factor 1)	0,0721
1,53	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	0,0844
-1,55	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	0,0913
-1,73	CFH	complement factor H	0,0188
-1,84	HLA-DRA	major histocompatibility complex, class II, DR alpha	0,0151
-2,97	FYB	FYN binding protein (FYB-120/130)	0,0024
-3,03	CXCL14	chemokine (C-X-C motif) ligand 14	0,0185
OTROS			
Inducción	Símbolo	Nombre	Valor de p
5,17	SPINK7	serine peptidase inhibitor, Kazal type 7 (putative)	0,0017
2,48	ALOX12B	arachidonate 12-lipoxygenase, 12R type	0,0034
2,38	CCNA1	cyclin A1	0,0079
2,35	PLAGL1	pleiomorphic adenoma gene-like 1	0,0575
2,11	RPTN	repetin	0,068
1,99	RORA	RAR-related orphan receptor A	0,075
1,95	DKK2	dickkopf homolog 2 (Xenopus laevis)	0,0219
1,92	VGLL3	vestigial like 3 (Drosophila)	0,0771
1,88	ELOVL7	ELOVL family member 7, elongation of long chain fatty acids (yeast)	0,0294
1,88	ODZ2	odz, odd Oz/ten-m homolog 2 (Drosophila)	0,0188
1,85	LMO7	LIM domain 7	0,0146
1,83	OCLN	occludin	0,0947
1,79	TTC9	tetratricopeptide repeat domain 9	0,0547
1,74	ODC1	ornithine decarboxylase 1	0,0245
1,67	PDPN	podoplanin	0,0294
1,64	CST6	cystatin E/M	0,0689
1,58	ID2	inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein	0,0612
1,57	BMP2K	BMP2 inducible kinase	0,068
1,57	IGFBP4	insulin-like growth factor binding protein 4	0,0909
-1,60	LYN	v-src-1 Yamaguchi sarcoma viral related oncogene homolog	0,0612
-1,99	MID1	Midline 1 (Opitz/BBB syndrome)	0,0402
-2,19	FGFR2	fibroblast growth factor receptor 2	0,0058
-2,23	VAV3	vav 3 oncogene	0,0034
-7,16	EZH1	Enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)	6,00E-04

Tabla 6. Genes inducidos y reprimidos más representativos, procedentes de los estudios genéticos por *microarrays* en los equivalentes de piel H- $\text{IKK}\alpha$ y H-Control. Se muestra la lista de genes organizados en diferentes categorías según su función génica más representativa y de interés para este trabajo: Adhesión, Diferenciación y Desarrollo Epidérmico, Proteólisis, Respuesta Inmune. En el apartado denominado “Otros” se incluyen genes que no pertenecen a ninguna de las categorías anteriores.